

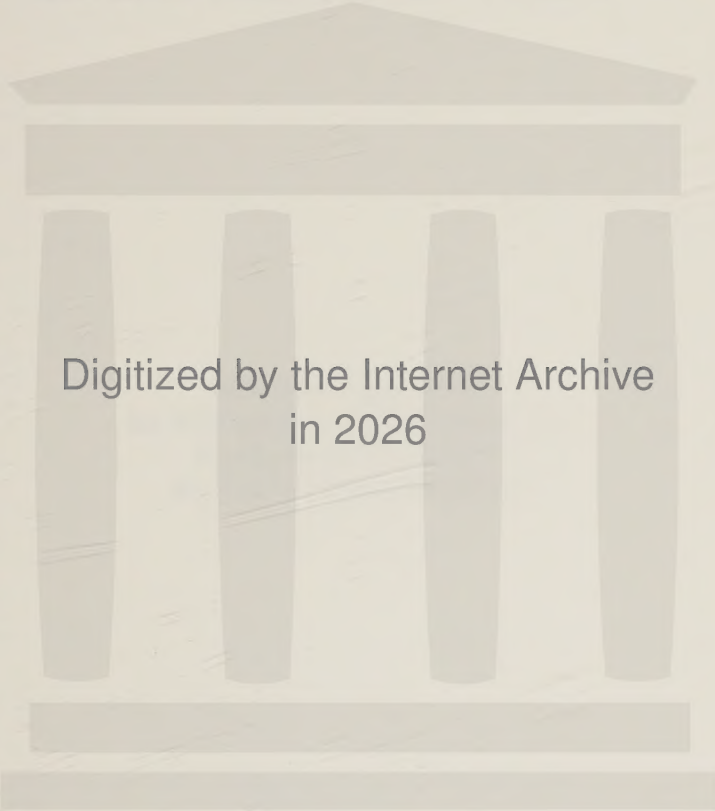
Untersuchungen über die Bildung des Knoblauchgeruchs in drei Marasmius-Arten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde des
Fachbereichs Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
HANS-HEINO LUXA
aus Lötzen/Ostpr.

Berlin 1976

Untersuchungen über die Wirkung
des Kaffees auf den
menschlichen Körper



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Untersuchungen über die Bildung des Knoblauchgeruchs in drei Marasmius-Arten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde des
Fachbereichs Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
HANS-HEINO LUXA
aus Lötzen/Ostpr.

Berlin 1976



Referent: Professor Dr. R. Gmelin

Korreferent: Professor Dr. H. Möhrle

Tag der mündlichen Prüfung:

Tag der Promotion:

23. 9. 76

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmakognosie und Phytochemie der Freien Universität Berlin ausgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. R. Gmelin für die Anregung, das vorliegende Thema zu bearbeiten, für seine engagierte Leitung, für zahlreiche wertvolle Ratschläge und oftmalige Ermunterung.

Den Herren Professor Dr. W. Steglich, Professor Dr. R. Gmelin, H. Michaelis und E. Gerhardt danke ich für das wertvolle Pflanzmaterial.

Herrn Dr. K. Roth, Institut für organische Chemie der Freien Universität Berlin, danke ich für die Aufnahme der ^{13}C -Spektren, Herrn Dr. G. Höfle, Institut für organische Chemie der Technischen Universität Berlin, für die Aufnahme der ^1H -NMR-Spektren und für die Aufnahme der Feld-Desorptions-Massen-Spektren danke ich Herrn Dr. D. Spitzner und Herrn G. Schwinger.

INHALTSVERZEICHNIS -----

	<u>Seite</u>
I. Einleitung und Problemstellung	11
II. Botanische Beschreibung von <i>Marasmius scorodonius</i> QUEL., <i>Marasmius alliaceus</i> JACQ. und <i>Marasmius prasioemus</i> FR.	15
III. Allgemeines über natürlich vorkommende schwefelhaltige Aminosäuren und schwefelhaltige Peptide	18
3.1. Vorkommen schwefelhaltiger Aminosäuren im Pflanzen- und Tierreich (und γ -Glutamylpeptide dieser Verbindungen)	18
3.2. Vorkommen von S-Alkyl-L-Cysteinsulfoxiden im Pflanzenreich	28
3.3. Vorkommen von γ -Glutamyl-Derivaten von S-Alkyl-L-Cysteinsulfoxiden	30
3.4. Aufbauende Enzyme	37
3.5. Abbauende Enzyme	39
IV. Eigene Untersuchungen	
Hauptteil	43
4.1. Ermittlung der Eigenschaften des Geruchs-Precursors von <i>Marasmius</i> -Arten durch DC- und PC-Vorproben	43
4.2. DC-Elektrophorese	46
4.3. Vorprüfung auf Beteiligung enzymatischer Prozesse bei der Geruchsbildung in den drei Pilzarten <i>Marasmius alliaceus</i> JACQ., <i>Marasmius prasioemus</i> FR., und <i>Marasmius scorodonius</i> QUEL.	49
4.3.1. Vorproben auf das Vorkommen von C-S-Lyasen in den drei Pilzarten	50
4.3.1.1. Gelfiltration der Rohenzym-lösungen	50
4.3.1.2. Prüfung der Gelfiltrate (geruchlose Pilzenzym-lösungen)	51

4.3.1.3. Prüfung der gelfiltrierten Pilzenzymlösungen mit S-Alkyl- L-Cysteinsulfoxiden auf C-S- Lyasen	51
4.3.2. Vorproben auf das Vorkommen von γ -Gluta- myltranspeptidasen in den drei Marasmius- Arten	52
4.3.2.1. Prüfung der gelfiltrierten Pilz- enzymlösungen auf γ -Glutamyltrans- peptidasen durch DC und PC	52
4.4. Isolierung der Geruchsprecursors aus Marasmius scorodonius QUEL. (PMS) und Marasmius alliaceus JACQ. (PMA)	54
4.5. Charakteristische Daten der Geruchsprecursors PMS und PMA	56
4.6. Charakterisierung der Geruchsprecursors durch spektroskopische Methoden	56
4.6.1. Vergleich der beiden Substanzen PMS und PMA durch IR-Spektroskopie	56
4.6.2. Feld-Desorptionsspektroskopie von PMS und PMA	57
4.6.3. ^1H -NMR-Spektroskopie von PMS und PMA	58
4.6.4. ^{13}C -NMR-Spektroskopie von PMA	60
4.7. Chemische Umsetzungen mit den Geruchsprecursors PMS und PMA	64
4.7.1. Saure Hydrolyse von PMS und PMA	64
4.7.2. Raney-Nickel-Spaltung von PMS und PMA	65
4.7.3. Spektroskopische Methoden zur Identi- fizierung der Spaltprodukte aus den Ra- ney-Nickel-Spaltungen	66
4.7.3.1. IR-Absorptionsspektroskopie	66
4.7.3.2. ^1H -NMR-Spektroskopie	66

	<u>Seite</u>
4.8. Strukturvorschlag für PMS und PMA	68
4.9. Vorläufige Charakterisierung der Enzyme der drei Marasmius-Arten	68
4.9.1. Charakterisierung und Aktivitätsbe- stimmung der γ -Glutamyltranspeptidase in Marasmius scorodonius QUEL. und Ma- rasmius alliaceus JACQ.	69
4.9.2. Aktivitätsbestimmungen der C-S-Lyasen in Marasmius scorodonius QUEL., Marasmius alliaceus JACQ. und Marasmius praeiosmus FR.	72
4.9.2.1. Abhängigkeit der Enzymaktivität vom pH-Wert	72
4.9.2.2. Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Temperatur	73
4.9.2.3. Substratspezifität der Pilz- enzyme	74
4.9.2.4. Nachweis von C-S-Lyase-Isoenzymen in den gefiltrierten Pilz- enzymlösungen	75
V. Eigene Untersuchungen	
Experimenteller Teil	81
5.1. Allgemeine Angaben	81
5.2. Extraktion der Droge	83
5.3. Isolierung des Geruchsprecursors PMA	83
5.3.1. Anreicherung der gesamten Aminosäuren und Peptide	83
5.3.2. Abtrennung der sauren Aminosäuren und Peptide	83
5.3.3. Feintrennung der sauren Aminosäure- und Peptid-Fraktion von 5.3.2.	84
5.4. Bereitung der Ionenaustauscher	84
5.4.1. Amberlite IR 120	84

	<u>Seite</u>
5.4.2. Lewatit MP 5080	85
5.4.3. Sephadex A 25 DEAE	85
5.5. Eigenschaften des Geruchsprecursors PMA	85
5.6. Spektroskopische Daten des Geruchsprecursors PMA	87
5.6.1. IR-Absorption	87
5.6.2. Feld-Desorptions-Massenspektroskopie	87
5.6.3. ^1H -NMR-Spektroskopie	87
5.6.4. ^{13}C -NMR-Spektroskopie	87
5.7. Chemische Umsetzungen mit dem Geruchsprecursor PMA	87
5.7.1. Saure Hydrolyse von PMA	87
5.7.2. Raney-Nickel-Spaltung von PMA	88
5.7.2.1. Eigenschaften des Spaltprodukts aus der Raney-Nickel-Spaltung	89
5.8. Isolierung und Charakterisierung des Geruchsprecursors PMS aus <i>Marasmius scorodoni</i> QUEL.	90
5.9. Bereitung der gefilterten Rohenzymlösung von <i>Albizzia lophantha</i>	91
5.10. Bereitung der Rohenzymlösungen aus Pilzen von <i>Marasmius scorodoni</i> QUEL. und <i>Marasmius alliaceus</i> JACQ.	91
5.11. Charakterisierung der γ -Glutamyltranspeptidase in den Pilzen <i>Marasmius alliaceus</i> JACQ. und <i>Marasmius scorodoni</i> QUEL.	92
5.12. Vorproben auf das Vorkommen von C-S-Lyase in den drei Pilzarten durch Nachweis der gebildeten Spaltprodukte	93
5.12.1. Brenztraubensäurenachweis (qualitativ)	93
5.12.2. Ammoniaknachweis (qualitativ)	94
5.12.3. Nachweis gebildeter Thiole	94

	<u>Seite</u>
5.12.3.1. Geruchsprobe	94
5.12.3.2. Isolierung von Benzylthiosulfinsäurebenzylester	94
5.13. Ammoniakbestimmung (quantitativ)	94
5.13.1. Aufstellung einer Eichkurve	95
5.14. pH-Abhängigkeit der Pilz C-S-Lyasen	95
5.15. Temperaturabhängigkeit der Aktivität von Pilz C-S-Lyasen	96
5.16. Substratspezifität der Pilz C-S-Lyasen	96
5.17. Disc-Elektrophorese	97
5.17.1. Bereitung der 7,5 proz. Polyacrylamid-gele	97
5.17.2. Durchführung der Elektrophorese	97
5.18. Synthesen der verwendeten Cysteinderivate mit einigen charakteristischen Daten	99
5.19. Elementaranalyse einiger neuer C-S-Lyase-Substrate	100
5.19.1. Zugehörige IR-Absorptionsbanden	100
5.19.2. Zugehörige UV-Spektren	101
VI. Diskussion	102
VII. Zusammenfassung	105
VIII. Literaturverzeichnis	107
IX. Lebenslauf	113

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

In der Pilzliteratur werden bei der Beschreibung von Pilzen häufig Gerüche zur näheren Charakterisierung und Unterscheidung von nahestehenden Arten herangezogen⁴³. Auch in der deutschen oder lateinischen Namensgebung finden sich oft Hinweise auf typische Geruchs- oder Geschmacksnoten: Herings-Täubling, *Clitocybe odora* (Anis-Trichterling), *Clitocybe suaveolens*, *Trametes benzoina*, *Osmoporus odoratus* (Fenchel-Tramete). Ein Teil der Gerüche konnte chemisch aufgeklärt werden.

Der Vanillingeruch, den *Mycele* von *Pleurotus ostreatus*, einem holzzerstörenden Pilz aufweisen, beruht auf dem Aufbau von Lignin unter Bildung von Vanillin als einem "sekundären Artefakt". Aus *Clitocybe odora* wurde 4-N-Nitrosomethylamino-benzaldehyd als riechendes Prinzip isoliert.

Eine Zusammenstellung von typischen Pilzgerüchen und ihre chemische Klassifizierung bringt PYYSALO⁵⁰ in einer Übersichtsarbeit.

Besonders auffallend durch ihren an Knoblauch, Küchenzwiebel oder gekochten Kohl erinnernden Geruch, ist eine Gruppe von Pilzen aus der Familie Tricholomataceae mit den Gattungen *Marasmius*, *Micromphale* und *Collybia*.

Marasmius alliaceus = langstieliger Knoblauch-Schwindling
Marasmius scorodonius (Scorodon griech. = Knoblauch) = *M. alliatus* (allium lat. = Knoblauch) Knoblauch-Schwindling
Marasmius prasiosmus (nach Lauch stinkend, pras = Lauch, osmus = Gestank)
Collybia brassicolens (nach Kohl riechend),
Micromphale foetidus (stinkend).

Wie die Namen erkennen lassen, sind hier die lauch- und kohlartigen Gerüche durch entsprechende griechische oder lateinische Bezeichnungen zum Ausdruck gebracht.

Die Geruchsbildung bei den letztgenannten Pilzarten ist bei feuchtwarmem Wetter besonders ausgeprägt. Mycelflächen im Wald fallen häufig durch Lauchgeruch auf, und auch die klei-

nen Fruchtkörper können unschwer durch den von ihnen verbreiteten Geruch erkannt werden, ähnlich dem allgemein bekannten Geruchsphänomen von *Phallus impudicus* (Stinkmorchel).

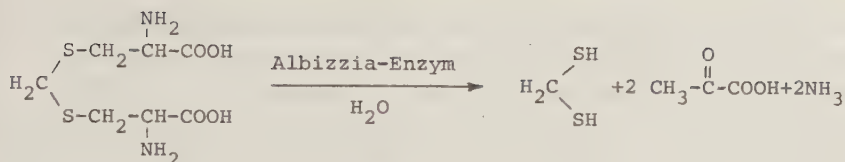
Wir stellten uns zur Aufgabe, die Geruchsstoffe obengenannter *Marasmius*-, *Micromphale*- und *Collybia*-Arten chemisch aufzuklären. Vorliegende Dissertationsarbeit befaßt sich speziell mit der Natur der Bildungsweise von Knoblauchgerüchen in *Marasmius alliaceus* JACQ. *Marasmius scorodoni* QUEL. und *Marasmius prasiosmus* FR.

Werden Pilze bei trockenem Wetter gesammelt, sind sie fast geruchlos. Sobald man sie anfeuchtet, verbreiten sie - vor allem *Marasmius scorodoni* QUEL. und *Marasmius prasiosmus* FR. - einen intensiven Knoblauchgeruch.

Auch mit Wasser angerührtes Pilzpulver entwickelt den typischen Geruch. Getrocknete Fruchtkörper von *Marasmius scorodoni* QUEL. wurden früher als Würzpilz aus Frankreich importiert (Mousseron), und auch noch heute setzen Pilzkenner *Marasmius scorodoni* QUEL. anstelle von Knoblauch Speisen zu.

Die bei Wasserzugabe auftretende Geruchsbildung erinnert sowohl in ihrer ganzen Natur, als auch in der sich entwickelnden Duftnote, an ein 1956 von GMELIN und Mitarbeitern¹⁶ beobachtetes Phänomen bei Endospermpulver der Mimosaceen-Arten *Albizia lophantha*, bei dem sofort nach Anfeuchten ebenfalls ein intensiver zwiebelartiger Geruch auftritt.

Wie gezeigt werden konnte, findet hierbei ein enzymatischer Angriff auf ein im Endosperm enthaltenes Substrat, L-Djenkolsäure, statt: Ein als "Albizia C-S-Lyase" bezeichnetes Enzym spaltet Djenkolsäure unter Bildung von Methylendithiol (dem Geruchsstoff), Brenztraubensäure und NH_3 .



Die Vermutung lag also nahe, daß auch bei den vorliegenden Marasmius-Arten analoge Enzymreaktionen mit pilzeigenen Substraten, genauer ausgedrückt, Alkyl-Derivaten von L-Cystein oder L-Cysteinsulfoxid, für die Geruchsbildung verantwortlich sind.

Wie unten noch eingehend dargestellt wird, sind solche S-Alkyl-L-Cysteine und ihre Sulfoxide als freie Aminosäuren und als γ -Glutamyl-dipeptide im Pflanzenreich äußerst weit verbreitet.

Tatsächlich waren die Pilzpulver von *Marasmius scorodionius* QUEL. und *Marasmius prasiosmus* FR. - weniger deutlich *Marasmius alliaceus* JAOQ. - oder Rohenzympräparate aus diesen Pilzen in der Lage, eine Anzahl von angebotenen synthetischen Substraten, wie L-Cystein, S-Methyl-, S-Äthyl-, S-Allyl-, S-Propyl- und S-Benzyl-L-Cystein unter Entwicklung starker Gerüche (H_2S bzw. R-SH), anzugreifen, besonders wenn die Substrate in Pufferlösung zwischen pH 7-8,5 gelöst waren.

Die entsprechenden Sulfoxide wurden ebenfalls angegriffen, wobei zunächst ein scharfer Geschmack in Erscheinung trat und später, nach einer Latenzzeit von mehreren Stunden, Geruchsbildung auftrat. Die Pilze scheinen demnach eine C-S-Lyase mit einem ähnlichen Substratspektrum, wie es für die Albizzia-C-S-Lyase beschrieben war (GMELIN und Mitarbeiter¹⁶, SCHWIMMER, KJAER und MAZELIS^{61,62}), zu enthalten.

Brenztraubensäure und Ammoniak, die typischen Spaltprodukte, konnten in den mit Pilzrohenzym versetzten Substratlösungen ebenfalls nachgewiesen werden. Diese Substanzen sind seit den Untersuchungen von STOLL und SEEBECK^{65,66} als Spaltprodukte der Alliinspaltung durch Alliinase bekannt.

Aber auch ohne Substratzusatz war in den inkubierten Pilzpulvern nach einer Latenzzeit von 2-4 Stunden die Bildung von Brenztraubensäure und Ammoniak chemisch nachweisbar. Sie mußten enzymatisch aus einem Precursor vom Typ Alkyl-L-Cystein entstanden sein. In methanolisch-wässrigen Auszügen aller drei Pilzarten konnte durch PC- und DC eine Ninhydrin-positive Substanz mit niederem Rf-Wert nachgewiesen werden.

Durch ihre positive Reaktion mit K_2PtJ_6 -Reagenz (allmähliche Entfärbung) gab sich diese Substanz als S-Derivat zu erkennen. Im inkubierten Pilzpulver verschwand diese Substanz im umgekehrten Verhältnis zur Neubildung von Brenztraubensäure und Ammoniak und des organoleptisch beobachteten Geruchsstoffes, sie schien also unmittelbar deren Precursor zu sein. Bei DC-Elektrophorese wanderte dieser vermutete Precursor anodisch - etwas langsamer als Glutaminsäure und etwa auf gleicher Höhe wie Glutathion - was auf Säurecharakter schließen ließ.

II. BOTANISCHE BESCHREIBUNG VON MARASMIUS SCORODONIUS QUEL.,
MARASMIUS ALLIACEUS JACQ. UND MARASMIUS PRASIOSMUS FR.

Marasmius scorodonius (FRIES 1815) QUEL. 1888 (= *alliatus* SCHAEFFER 1774), der Küchen-Schwindling, Mousseron, Knoblauchpilz, *Marasmius alliaceus* JACQUIN 1773 ex FR. 1836, der langstielige Knoblauch-Schwindling und *Marasmius praiosmus* FR. 1836, der große Knoblauch-Schwindling, gehören zu den Basidiomyceten oder Ständerpilzen, Ordnung: Agaricales = Blätterpilze, Familie: Tricholomataceae = Ritterlingartige, Tribus: Marasmicae⁴³.

Marasmius scorodonius QUEL. (Abb. 1) ist ein kleiner, ledriger, zäher Pilz, der einen pfenniggroßen (1-3 cm), runzeligen und blaßrotbräunlichen Hut besitzt. Der Stiel ist am Grund dunkelbraun und wird zum Hut heller, ist dünn und glänzend, etwa 5 cm lang und bis zu 2 mm dick, röhrig.

Die Blätter sind weißlich, trocken, kraus und am Grund häufig aderig verbunden. Das Fleisch ist blaß und zäh. Es riecht nach Knoblauch, der Geruch wird besonders intensiv, wenn der Pilz in Wasser eingeweicht wird. Die Sporen sind 5-7 x 3-5 µm groß, an einem Ende ausspitzend und weiß.

Der Pilz ist in der Zeit von Juni bis Oktober, besonders in feuchten Jahren, an Graswurzeln und in Wäldern zu finden.

Besonders zahlreich tritt *Marasmius scorodonius* QUEL. nach sehr starken Regengüssen auf. Bei Trockenheit schrumpft er wie alle Schwindlinge, lebt dann aber wieder bei feuchter Witterung auf.

Von alters her ist *Marasmius scorodonius* QUEL. bei Pilzkennern ein sehr geschätzter Würzpilz für Braten und Soßen. Beim Kauen des frischen Pilzes tritt ein zwiebelartig-lauchartiger Geschmack auf.

Marasmius alliaceus JACQ. (Abb. 2) besitzt jung einen milchweißen, später fleischocker bis umberbräunlichen Hut, der oft

runzelig ist. Der Hut ist ferner halbkugelig-flach, 2-4 cm breit, am Rand glatt oder gerieft. Die Blätter sind schmutzig-weißlich-holzfarbig, ziemlich breit und fast entfernt. Der Stiel ist braunschwarz, 8-10 cm, manchmal sogar 20 cm lang und 0,1-0,2 cm breit. Er ist matt filzig-bereift, stark wurzelnd und mitunter am Ende kleinknollig. Das Fleisch hat ebenfalls einen anhaltenden, fast unangenehmen Knoblauchgeruch. Auch der Geschmack des Pilzes ist lauch-zwiebelartig. Die Sporen sind farblos, rundlich-eiförmig und 7-11 x 6-8 um groß.

Marasmius alliaceus JACQ. kommt im August bis Oktober in Buchenwäldern vor. Der Pilz wurzelt tief im Laub und ist auch auf vermoderndem Holz zu finden. *Marasmius alliaceus* JACQ. ist nicht häufig anzutreffen.

Marasmius prasiosmus FR. (Abb. 3) besitzt bei Feuchtigkeit einen dunkelbraunen und durchsichtig gerieften Hut, der bei Trockenheit lederblaß wird. Er ist 2-4 cm breit und flach gewölbt. Die Blätter sind holzfarbig, schmal, sie sitzen fast gedrängt und sind abgerundet. Der Stiel ist schwach dunkelbraun, nach oben zu wird er blasser mit fast filzig-flaumiger Oberfläche. Er ist 6-8 cm lang und 0,2-0,4 cm breit.

Das Fleisch besitzt einen etwas brennenden Zwiebelgeschmack und riecht feucht stark nach Knoblauch. Die Sporen sind lanzettlich etwa 7-10 um lang und 4-5 um breit. Der Pilz ist im Oktober und November im Laubwald, besonders unter Eichen, zu finden.

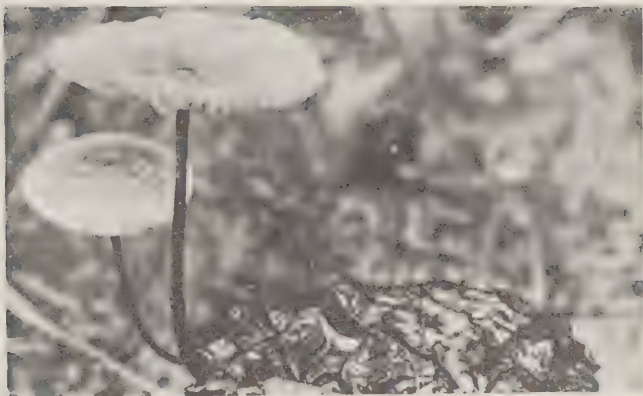


Abb. 1: *Marasmius scorodonius* QUEL.



Abb. 2: *Marasmius alliaceus* JACQ.



Abb. 3: *Marasmius praiosmus* FR.

III. ALLGEMEINES ÜBER NATÜRLICH VORKOMMENDE SCHWEFELHALTIGE⁺) AMINOSÄUREN UND S-HALTIGE PEPTIDE

Nach der einleitenden Beschreibung der Problemstellung dieser Arbeit, in deren weiterem Verlauf die Isolierung, Strukturaufklärung und verschiedene Abbaureaktionen eines neuen, komplizierten S-haltigen Naturstoffs beschrieben wird, soll zunächst ein kurzer Überblick über natürlich vorkommende S-haltige Aminosäuren und S-haltige Peptide gegeben werden. Dazu gehören ihre Verbreitung im Pflanzen- und Tierreich, ihre Biosynthese - soweit bekannt - und ihre enzymatischen Abbaureaktionen. Die biochemische und physiologische Rolle soll dabei skizziert werden.

Die Analogien eines neuen Naturstoffs aus Pilzen lassen sich an Hand einer derartigen Übersicht besser erkennen. Seine Besonderheiten machen aber auch deutlich, daß das bisher gültige Schema S-haltiger Naturstoffe erweitert wird, und zusammen mit einem kürzlich entdeckten neuen Antibiotikum, Sparosomycin¹, sowie einem von YASUMOTO und Mitarbeitern⁹⁰ aus dem "shii-take"-Pilz, *Lentinus edodes*, isolierten neuen Naturstoff, Lentinic Acid, eine neue "Generation" S-haltiger Naturstoffe repräsentieren, deren Biogenese und biologische Rolle der Forschung tatsächlich interessante, neue Aufgaben stellen.

3.1. Vorkommen S-haltiger Aminosäuren im Pflanzen- und Tierreich

S-Alkyl-L-Cysteine kommen im freien Zustand vor allem in den Familien Fabaceae und Mimosaceae vor.

S-Methyl-L-Cystein wurde aus verschiedenen Phaseolus- und Astragalus-Arten¹¹ isoliert.

Bei einigen auf selenhaltigen Böden wachsenden Astragalus-Arten¹¹ konnten Seleno-Methylcystein als toxische Substanz

+) im folgenden soll der Ausdruck Schwefel durch den Buchstaben S ersetzt werden.

nachgewiesen werden, die beim Vieh Vergiftungen hervorrufen kann. In dieser Verbindung ist S durch Se ersetzt.

In den Samen verschiedener Mimosaceen-Arten fanden GMELIN^{15,17}, (18, 21) und Mitarbeiter eine große Anzahl neuer S-haltiger, nicht proteinogener Aminosäuren, nachdem schon vor längerer Zeit durch VAN VEEN⁷⁷ Djenkolsäure aus der "Djenkolbohne", *Pithecellobium lobatum*, isoliert und als außergewöhnliche S-Aminosäure erkannt worden war.

In *Albizia julibrissin* wurde S-(β -Carboxyäthyl)-L-Cystein²¹ gefunden, in einigen *Acacia*-Arten S-(β -Carboxyisopropyl)-L-Cystein¹⁷ neben S-(β -Carboxyäthyl)-L-Cystein und Djenkolsäure. In *Acacia farnesiana* wurde N-Acetyl-L-Djenkolsäure¹⁸ gefunden und aus Samen von *Dichrostachys glomerata* konnte eine komplizierte neue S-Aminosäure¹⁵ isoliert werden, die neben einer Thioäthergruppe auch eine Sulfongruppe enthielt:



ITO und FOWDEN²⁸ fanden später in Samen von *Acacia georginae* die reduzierte Form von Dichrostachinsäure, die sich biogenetisch von Djenkolsäure durch Austausch einer NH_2 -Gruppe gegen eine OH-Gruppe ableitet.

Dichrostachinsäure gehört übrigens zu den wenigen Naturstoffen mit einer SO_2 -Gruppe. In *Equisetum*-Arten wurde ein Dimethylsulfon³¹ gefunden. Glucocheirolin⁵⁹ und Glucoerysolin¹⁹, zwei Glucosinolate in *Cheirantus cheiri* und *Erysimum perofskianum*, sind weitere Vertreter dieser Klasse.

Die kürzlich von YASUMOTO und Mitarbeitern⁹⁰ aus dem japanischen "Shii-take"-Pilz isolierte Lentininsäure, die fast gleichzeitig und unabhängig von GMELIN und Mitarbeitern²⁰ aus den einheimischen Pilzen *Collybia hariolorum* und *Micromphale perforans* isoliert wurde, ist nach Dichrostachinsäure und Glucoerysolin der jüngste Vertreter natürlicher Sulfonverbindungen.

In Mimosaceen-Arten werden die zahlreichen, nichtproteinogenen

S-Aminosäuren, die übrigens einen Gehalt von 2-4 % des Endosperms aufweisen, von vielen zusätzlichen, nicht proteino-genen Aminosäuren begleitet, wie L- α , β -Diaminopropionsäure, Albizziin [L-2-Amino-3-ureidopropionsäure], Williardiin [β -(1-Uracyl)-L-Alanin], Leucanol L- γ -Methylglutaminsäure L-Äthylidenglutaminsäure, Mimosin [β -N-(3-Hydroxy-4-pyridon)- α -aminopropionsäure], sowie von cyclischen Homologen des L-Prolins wie L-Pipecolinsäure, L-4-Hydroxypipecolinsäure, L-5-Hydroxypipecolinsäure³².

Felinin, ein S-(4-Hydroxy-2-methyl-2-butyl)-L-Cystein wurde aus Katzenurin isoliert⁹². Eine ähnliche Verbindung, nämlich Isovalthin⁴⁷, wurde auch im Urin von Menschen als pathologisches Ausscheidungsprodukt nachgewiesen.

Halogenierte Kohlenwasserstoffe und halogenierte Aromaten werden im tierischen und menschlichen Organismus durch Bindung an L-Cystein unter Austausch des Halogens und Bildung einer Thioätherbindung entgiftet. Die hierbei als Zwischenprodukte auftretenden S-Alkyl- bzw. 2-Aryl-L-Cysteine werden in der Niere acetyliert und als sogenannte "Merkaptursäuren" mit dem Urin ausgeschieden. Primär erfolgt die Umsetzung der toxischen Substanz mit Glutathion, unter Bildung von S-Alkyl- bzw. S-Aryl-Glutathion-Derivaten. Durch γ -Glutamyl-Transpeptidasen und Amino- und Carboxy-Peptidasen werden diese Tripeptid-Derivate zur freien Cysteinverbindung gespalten.

Das Vorkommen von S-Alkyl-Glutathion-Derivaten in Allium-Arten sowie das sehr häufige Vorkommen von γ -Glutamyl-S-Alkylcysteininen und deren Sulfoxiden in Allium-Arten und vielen anderen Familien (Fabaceae, Mimosaceae etc.) läßt vermuten, daß zumindest ein Teil der in der Natur vorkommenden S-Alkyl-L-Cysteine und S-Alkyl-L-Cysteinsulfoxide analog aus S-alkyliertem Glutathion hervorgehen. Bei Mimosaceen-Arten mit Djenkolsäure als typischer S-Verbindung, wäre auch ein Biogeneseweg durch direkte Kondensation von H_2S , Brenztraubensäure, Ammoniak und einem Formaldehydäquivalent (z. B. Glyoxalsäure) unter Beteiligung von C-S-Lyasen in umkehrbarer Reaktion denkbar, doch müßten erst Untersuchungen mit markierten Vorstufen

und Bausteinen durchgeführt werden, um diese Hypothese zu stützen.

Aus dem Pilz *Rozites caperata*⁸⁷ wurde kürzlich S-L-2-Amino-äthyl-L-Cystein, das als Isosteres von L-Lysin (Thialysin) betrachtet werden kann, als natürliche Aminosäure isoliert.

Tabelle I bringt eine Aufstellung der bis heute bekannten S-Alkyl-L-Cysteine im Pflanzen- und Tierreich:

Tabelle I:

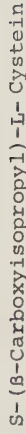
S-Alkyl-L-Cysteine im Pflanzen- und Tierreich

(Nomenklatur wurde aus der Originalliteratur übernommen)

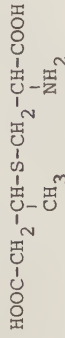
S-Methyl-L-Cystein	Phaseolus vulgaris L.	10,72	Fabaceae
	Vigna aureus SAVI	10	
	Vigna unguiculata SAVI	10	
$\text{CH}_3\text{-S-CH}_2\text{-CH-COOH}$ NH ₂	Pisum sativum L.	10	
	Cajanus cajan SPR.	10	
	Vicia faba major L.	10	
	Vicia faba minor L.	10	
	Glycine max. L.	10	
	Lupinus albus L.	10	
	Astragalus-Arten	11	
S-Allyl-L-Cystein	Allium cepa L.	26	Liliaceae
$\text{CH}_2=\text{CH-CH}_2\text{-S-CH}_2\text{-CH-COOH}$ NH ₂	Allium sativum L.	69	
S-(β-Carboxypropyl)-L-Cystein	Allium cepa L.	23	
$\text{CH}_3\text{-CH-CH}_2\text{-S-CH}_2\text{-CH-COOH}$ COOH NH ₂	Allium sativum L.	68	
S-(β-Carboxyäthyl)-L-Cystein	Albizzia julibrissin DURAZZ.	21	Mimosaceae



Acacia millefolia S. WATS. 21
Acacia-Arten 32



Mimosaceae



Acacia millefolia S.WATS. 17
Acacia willardiana ROSE 17
Acacia-Arten 33



Acacia georginae F.M. BAILEY 28



Pithecellobium lobatum BENTH.77



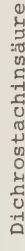
Albizzia lophantha BENTH. 16
Acacia lemmoni ROSE 14
Acacia willardiana ROSE 14



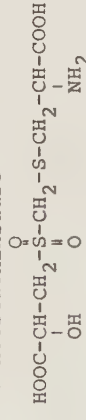
Acacia farnesiana WILLD. 18



Desmanthus brachylobus BENTH.52

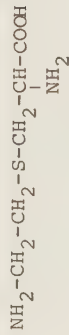


Dichrostachys glomerata HUTCH.15



Leucaena glauca BENTH. 32
Leucaena leucocephala DE WIT 64
Neptunia oleracea LOUR. 15

S-L-2-Aminoäthyl-L-Cystein



Rozites caperata

87

Basidiomycetae

Isovalthin



Urin von hypercholesterinämischen

Patienten

47

Felinin



Urin von Katzen

92

In Tabelle II sind einige γ -Glutamyl-L-Cystein-Derivate von S-Alkyl-L-Cysteinen sowie S-Alkyl-Glutathione und ihr Vorkommen im Pflanzen- und Tierreich zusammengestellt:

Tabelle II:

γ-Glutamyl-L-Cystein-Derivate von S-Alkyl-Derivaten und S-Alkyl-Glutathione
(Nomenklatur wurde aus der Originalliteratur übernommen)

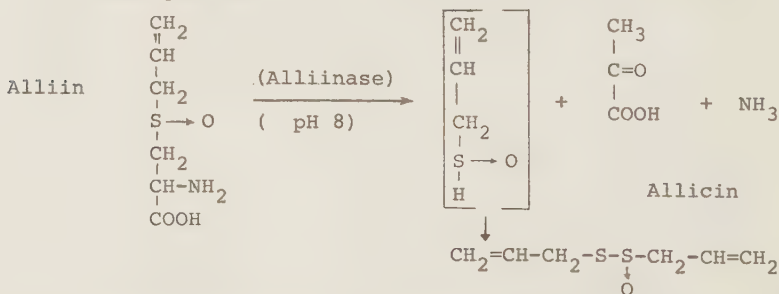
γ-L-Glutamyl-L-Cystein			
$\text{HS}-\text{CH}_2-\underset{\text{COOH}}{\underset{\text{O}}{\parallel}}-\text{NH}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\underset{\text{O}}{\parallel}}-\text{CH}-\text{COOH}$	Allium schoenoprasum L.	83	Liliaceae
γ-L-Glutamyl-S-Methyl-L-Cystein			
$\text{CH}_3-\text{S}-\text{CH}_2-\underset{\text{COOH}}{\underset{\text{O}}{\parallel}}-\text{NH}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\underset{\text{O}}{\parallel}}-\text{CH}-\text{COOH}$	Allium cepa L.	81	
	Allium sativum L.	67	
	Phaseolus vulgaris L.	91	Fabaceae
	Phaseolus lunatus L.	91	
γ-L-Glutamyl-S-n-Propyl-L-Cystein			
$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underset{\text{COOH}}{\underset{\text{O}}{\parallel}}-\text{NH}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\underset{\text{O}}{\parallel}}-\text{CH}-\text{COOH}$	Allium sativum L.	78	Liliaceae
	Allium schoenoprasum L.	83	
γ-L-Glutamyl-S-(Propen-1-yl)-L-Cystein			
$\text{CH}_3-\text{CH}=\text{CH}-\text{S}-\text{CH}_2-\underset{\text{COOH}}{\underset{\text{O}}{\parallel}}-\text{NH}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\underset{\text{O}}{\parallel}}-\text{CH}-\text{COOH}$	Allium schoenoprasum L.	83	

γ -L-Glutamyl-L-Djenkolsäure	Acacia georginae F.M.BAILEY	63	Mimosaceae
$\text{HOOC}-\underset{\text{NH}_2}{\underset{ }{\text{CH}}}_2-\underset{\text{NH}_2}{\underset{ }{\text{CH}}}_2-\underset{\text{COOH}}{\underset{ }{\text{C}}}-\underset{\text{COOH}}{\underset{ }{\text{CH}}}_2-\underset{\text{NH}_2}{\underset{ }{\text{CH}}}_2-\text{S}-\underset{\text{NH}_2}{\underset{ }{\text{CH}}}_2-\underset{\text{COOH}}{\underset{ }{\text{C}}}-\underset{\text{NH}_2}{\underset{ }{\text{CH}}}_2-\text{CH}-\text{COOH}$			
N,N'-Bis-(γ -Glutamyl)-3,3'-(2-methyl-äthylen-1,2-dithio)dialanin	Allium schoenoprasum L.	38	Liliaceae
$\text{HOOC}-\underset{\text{NH}_2}{\underset{ }{\text{CH}}}_2-\underset{\text{NH}_2}{\underset{ }{\text{CH}}}_2-\underset{\text{COOH}}{\underset{ }{\text{C}}}-\underset{\text{COOH}}{\underset{ }{\text{CH}}}_2-\underset{\text{CH}_3}{\underset{ }{\text{CH}}}=\underset{\text{COOH}}{\underset{ }{\text{C}}}-\underset{\text{COOH}}{\underset{ }{\text{CH}}}_2-\underset{\text{NH}_2}{\underset{ }{\text{CH}}}_2-\underset{\text{NH}_2}{\underset{ }{\text{CH}}}_2-\underset{\text{COOH}}{\underset{ }{\text{C}}}-\underset{\text{NH}_2}{\underset{ }{\text{CH}}}_2-\text{CH}-\text{COOH}$			
N,N'-Bis-(γ -Glutamyl)-L-Cystin	Allium schoenoprasum L.	38	
$\text{HOOC}-\underset{\text{NH}_2}{\underset{ }{\text{CH}}}_2-\underset{\text{NH}_2}{\underset{ }{\text{CH}}}_2-\underset{\text{COOH}}{\underset{ }{\text{C}}}-\underset{\text{COOH}}{\underset{ }{\text{CH}}}_2-\underset{\text{COOH}}{\underset{ }{\text{C}}}-\underset{\text{COOH}}{\underset{ }{\text{CH}}}_2-\underset{\text{NH}_2}{\underset{ }{\text{CH}}}_2-\underset{\text{NH}_2}{\underset{ }{\text{CH}}}_2-\underset{\text{COOH}}{\underset{ }{\text{C}}}-\underset{\text{NH}_2}{\underset{ }{\text{CH}}}_2-\text{CH}-\text{COOH}$			
S-(2-Carboxypropyl)-Glutathion	Allium cepa L.	86, 68	
$\text{CH}_3-\underset{\text{COOH}}{\underset{ }{\text{CH}}}_2-\underset{\text{COOH}}{\underset{ }{\text{CH}}}_2-\underset{\text{COOH}}{\underset{ }{\text{C}}}-\underset{\text{COOH}}{\underset{ }{\text{CH}}}_2-\underset{\text{NH}_2}{\underset{ }{\text{CH}}}_2-\underset{\text{NH}_2}{\underset{ }{\text{CH}}}_2-\underset{\text{NH}_2}{\underset{ }{\text{CH}}}_2-\underset{\text{COOH}}{\underset{ }{\text{C}}}-\underset{\text{NH}_2}{\underset{ }{\text{CH}}}_2-\text{CH}-\text{COOH}$	Allium sativum L.	86	
<u>Im Tierreich:</u>			
S-(α , β -Dicarboxyäthyl)-Glutathion	Augenlinse des Kalbs	5	
$\text{HOOC}-\underset{\text{COOH}}{\underset{ }{\text{CH}}}_2-\underset{\text{COOH}}{\underset{ }{\text{CH}}}_2-\underset{\text{COOH}}{\underset{ }{\text{C}}}-\underset{\text{COOH}}{\underset{ }{\text{CH}}}_2-\underset{\text{NH}_2}{\underset{ }{\text{CH}}}_2-\underset{\text{NH}_2}{\underset{ }{\text{CH}}}_2-\underset{\text{NH}_2}{\underset{ }{\text{CH}}}_2-\underset{\text{COOH}}{\underset{ }{\text{C}}}-\underset{\text{NH}_2}{\underset{ }{\text{CH}}}_2-\text{CH}-\text{COOH}$			

3.2. Vorkommen von L-Alkyl-L-Cysteinsulfoxiden im Pflanzenreich

Natürliche Sulfoxide, deren SO-Gruppe übrigens chiral ist, $\overset{\text{O}}{\underset{|}{\text{-S-}}}$, und die deshalb den polarisierten Lichtstrahl drehen, sind erst seit etwa 25 Jahren bekannt. SCHMID und KARRER⁵⁸ konnten aus Samen von *Raphanus sativus* nach enzymatischer Spaltung ein Sulforaphen isolieren und aufklären: $\text{CH}_3\text{-SO-CH=CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N=C=S}$. In Cruciferen-Arten wurden später noch eine große Anzahl zusätzlicher Glucosinolate und Isothiocyanate mit optisch aktiver Sulfoxidgruppe gefunden (Glucoiberin, Glucoraphanin, Glucoalyssin, Glucoarabin, Glucocamelinin etc.). STOLL und SEEBECK⁶⁵ konnten 1946 aus Zwiebeln von *Allium sativum* die Vorstufe des antimikrobiellen Prinzips ALLICIN in Form einer SO-Aminosäure, ALLIIN, isolieren und strukturell aufklären. Sie fanden, daß Alliin in den Zwiebeln von einem sehr aktiven Enzym mit hoher Spezifität begleitet ist und nannten dieses Enzym nach seinem Substrat "Alliinase".

Allicin wird aus Alliin nach folgendem enzymatischen Reaktionsschema gebildet:



Eine intermediär gebildete Zwischenstufe, Allyl-SOH, dimerisiert sofort zu Allyl-S-SO-Allyl(=Allicin). Pyridoxalphosphat (PALP) wurde als Coenzym von Alliinase erkannt und ist, wie später gefunden wurde, das Coenzym aller vorkommenden C-S-Lyasen. Die Aldehydgruppe von PALP bildet mit der Aminogruppe des Substrats eine Schiff'sche Base. Unter Mitwirkung von Metallatomen werden

Nebenvalenzen gebildet und unter α , β -Eliminierung⁴⁹ wird R-SH bzw. R-SOH abgespalten. Die hierbei gebildete α -Aminoacrylsäure zerfällt spontan weiter zu Brenztraubensäure und Ammoniak. Alliinase spaltet bevorzugt Alliin. S-Methyl-, S-Äthyl-, S-Propyl-, S-Butyl- und S-Benzyl-L-Cysteinsulfoxid werden beträchtlich langsamer gespalten. Später aufgeführte C-S-Lyasen wie z. B. die Albizzia- und die Marasmius C-S-Lyase weisen ein breiteres Spektrum gegenüber verschiedenen Substraten auf und unterscheiden sich vor allem dadurch von Alliinase, daß sie auch L-Cystein und S-Alkyl- und S-Aryl-L-Cysteine, d. h. auch die Thioäther-Derivate spalten können.

ARNOLD und THOMPSON³ fanden in Brassica oleracea -Arten ein S-Methyl-L-Cysteinsulfoxid, dessen Absolutkonfiguration an der chiralen SO-Gruppe durch Röntgenstrukturanalyse festgelegt werden konnte.¹⁰⁰ Sie ist eigenartigerweise gerade entgegengesetzt wie die der natürlich vorkommenden Glucosinolat-Sulfoxide, z. B. Glucoiberin.⁹⁹ Auch in Allium-Arten konnte S-Methyl-L-Cysteinsulfoxid²⁵ nachgewiesen werden. Eine weitere häufige S-haltige Aminosäure in Allium-Arten ist S-Propyl-L-Cysteinsulfoxid²⁶. In Tulbaghia violacea wurde ein S-Äthyl-L-Cysteinsulfoxid²⁹ gefunden.

In der Küchenzwiebel fanden VIRTANEN und MATIKKALA⁸³ ein Cycloalliin, das aber vermutlich ein Artefakt ist und aus einer genuinen S-haltigen Aminosäure, dem S-Propenyl-L-Cysteinsulfoxid (also einem Isomeren von Alliin), unter alkalischen Bedingungen entsteht. S-Propenyl-L-Cysteinsulfoxid wird von einem spezifischen Enzym begleitet. Beim Zerschneiden von Küchenzwiebeln tritt bekanntlich ein sehr scharfer, zu Tränen reizender Geruch auf. Wie MOISIO, SPÄRE und VIRTANEN⁴⁴ zeigen konnten, wird dabei S-Propenyl-L-Cysteinsulfoxid enzymatisch zu Brenztraubensäure, Ammoniak und dem Tränenreizstoff gespalten. Der Tränenreizstoff, zuerst fälschlicherweise als $\text{CH}_3\text{-CH=CH-SOH}$ bezeichnet,⁸² besitzt die Struktur $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH=S=O}$ und verdankt seine tränenreizende Wirkung der Reaktivität der -CH=S=O -Gruppe mit freien SH-Gruppen. Vgl. hierzu die Struktur von Acrolein und die Reaktivität weiterer Tränenreizstoffe mit SH-Gruppen wie Chloracetophenon, Benzyljodid, Jodessig-

äthylester etc.

Das Vinylanaloge zu Cycloalliin wurde von KURIYAMA, TAKAGI und MURATA³⁵ aus einer Meeresalge, *Chondria crassicaulis*, isoliert, in der es vermutlich ebenfalls genuin als S-Vinyl-L-Cysteinsulfoxid vorkommt.

Überraschend wurde S-Propenyl-L-Cysteinsulfoxid später auch in *Santalum album*³⁶ gefunden.

Die Chiralität der SO-Gruppe weist darauf hin, daß enzymatische Prozesse bei der Oxidation der Thioäthergruppe zur SO-Gruppe beteiligt sind, obwohl die Thioäthergruppe, vor allem in Gegenwart katalysierender Metallionen, auch leicht beim Lagern an der Luft, spontan zur SO-Gruppe oxidiert werden kann.

Bei den nichtpublizierten Untersuchungen an *Collybia hariolorum* fanden GMELIN und Mitarbeiter²⁰, daß S-Alkyl-L-Cysteine durch eine noch nicht näher untersuchte "Sulfoxidase" quantitativ und rasch zu den entsprechenden SO-Verbindungen umgesetzt werden. Eingehendere Untersuchungen folgen.

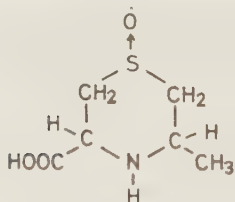


Abb. 4: Cycloalliin

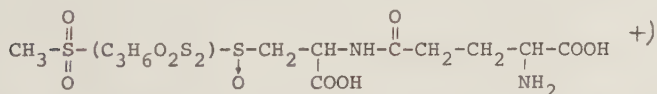
3.3. Vorkommen von γ -Glutamyl-Derivaten von S-Alkyl-L-Cysteinsulfoxiden

Es sind wiederum die wichtigen Beiträge von VIRTANEN und Mitarbeiter, die uns - vor allem in verschiedenen Allium-Arten - eine große Anzahl von γ -Glutamyl-L-Cysteinsulfoxiden vermittelt haben. Diese Dipeptide scheinen Reserveformen darzustellen, da sie beim Auskeimen der zwiebelartigen Speicherorgane verschwinden. Eingehendere biochemische und pflanzenphysiologische Untersuchungen sind jedoch erforderlich, um nähere Aussagen über ihre physiologische Rolle und ihre Funktionen

in der Entwicklung der Pflanzen oder etwa bei Abwehrmechanismen machen zu können.

Überraschend wurde im Rahmen dieser Arbeit ein analoger Typ von γ -Glutamyl-L-Cysteinsulfoxiden im Falle des Geruchs-Precursors in Marasmius-Arten und im Falle des Aroma-Precursors von *Lentinus edodes*⁹⁰, *Collybia hariolorum* und *Micromphale perforans*²⁰ gefunden. Diese beiden Precursor-Typen werden, wie später noch ausführlich beschrieben wird, in einem zweistufigen Enzymprozeß a) durch eine γ -Glutamyl-transpeptidase b) durch eine C-S-Lyase gespalten. Es ist denkbar, daß auch in den höheren Pflanzen solche zweistufigen Enzymprozesse beteiligt sind, und eine entsprechende Hypothese wurde bereits aufgestellt, um die aktive Ausscheidung von Geruchsstoffen bei *Allium*-Arten, vor allem bei *Allium ursinum* und *Allium paradoxum*, zu erklären.

Der wesentliche Unterschied zwischen den bisher bekannten Vertretern und den S-haltigen Pilzinhaltsstoffen besteht darin, daß in γ -Glutamyl-Marasmin: $\text{CH}_3\text{-S-CH}_2\text{-S-CH}_2\text{-CH(NH-C(=O)-CH}_2\text{-CH-COOH)}$ und, verstärkt noch in Lentininsäure,



Seitenketten mit alternierenden S-C-Sequenzen vorliegen, deren Entstehung nach einem bisher unbekannten Biogeneseprinzip erfolgen muß. Auch im Sparsomycin (Abb. 5)

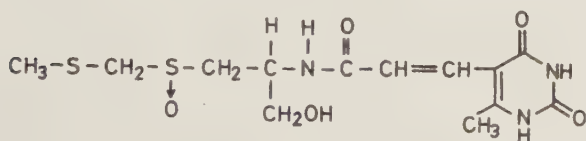


Abb. 5: Sparsomycin

einem Streptomyceten-Antibiotikum, dessen S-haltige Teilstruktur als Marasminol aufgefaßt werden kann, ist dieses neue Biogeneseprinzip verwirklicht.

+) HÖFLE, GMELIN, LUXA, TREVES und HATANAKA Publikation in Vorbereitung

Tabelle III bringt eine Zusammenfassung über natürliche S-Alkyl-L-Cysteinsulfoxide und deren γ -Glutamyl-Derivate im Pflanzenreich:

Tabelle III:

S-Alkyl-L-Cysteinsulfoxide und deren γ -Glutamyl-Derivate im Pflanzenreich
(Nomenklatur wurde aus der Originalliteratur übernommen)

S-Methyl-L-Cysteinsulfoxid					
$\text{CH}_3-\text{S}-\underset{\substack{\downarrow \\ \text{O}}}{\text{CH}_2}-\underset{\substack{ \\ \text{NH}_2}}{\text{CH}}-\text{COOH}$		Allium cepa L.	79		Liliaceae
		Allium ascalonicum STRAND	76		
		Brassica-Arten	70		Brassicaceae
S-Äthyl-L-Cysteinsulfoxid					
$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\underset{\substack{\downarrow \\ \text{O}}}{\text{S}}-\text{CH}_2-\underset{\substack{ \\ \text{NH}_2}}{\text{CH}}-\text{COOH}$		Tulbaghia violacea HARV.	29		Amaryllidaceae
		Brodiaea uniflora ENGL.	76		Liliaceae
S-Propyl-L-Cysteinsulfoxid					
$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\underset{\substack{\downarrow \\ \text{O}}}{\text{S}}-\text{CH}_2-\underset{\substack{ \\ \text{NH}_2}}{\text{CH}}-\text{COOH}$		Allium cepa L.	26		
		Brodiaea uniflora ENGL.	76		
S-Allyl-L-Cysteinsulfoxid (Alliin)					
$\text{CH}_2=\text{CH}-\underset{\substack{\downarrow \\ \text{O}}}{\text{CH}_2}-\underset{\substack{ \\ \text{NH}_2}}{\text{S}}-\text{CH}_2-\underset{\substack{ \\ \text{NH}_2}}{\text{CH}}-\text{COOH}$		Allium sativum L.	26		
trans(+)-S-(propen-1-yl)-L-Cysteinsulfoxid		Allium schoenoprasum L.	83		
$\text{CH}_3-\text{CH}=\text{CH}-\underset{\substack{\downarrow \\ \text{O}}}{\text{S}}-\text{CH}_2-\underset{\substack{ \\ \text{NH}_2}}{\text{CH}}-\text{COOH}$		Allium cepa L.	44		
		Santalum album L.	36		Santalaceae

S-(2-Carboxypropyl)-L-Cysteinsulfoxid $\begin{array}{c} \text{CH}_3 - \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{S} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\ \quad \quad \quad \quad \quad \quad \\ \text{COOH} \quad \quad \text{O} \quad \quad \text{NH}_2 \end{array}$	Allium cepa L.	23	Liliaceae
S-(β-Carboxyisopropyl)-L-Cysteinsulfoxid $\begin{array}{c} \text{HOOC} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{S} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\ \quad \quad \quad \quad \quad \quad \\ \text{CH}_3 \text{O} \quad \quad \text{NH}_2 \end{array}$	Acacia millefolia S.WATS. Acacia willardiana ROSE	21 21	Mimosaceae
S-(β-Carboxyethyl)-L-Cysteinsulfoxid $\begin{array}{c} \text{HOOC} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{S} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\ \quad \quad \quad \quad \quad \quad \\ \text{O} \quad \quad \quad \text{NH}_2 \end{array}$	Acacia aneura F.MUELL. Acacia-Arten	63 63	
L-Djenkolsäuresulfoxid $\begin{array}{c} \text{HOOC} - \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{S} - \text{CH}_2 - \text{S} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\ \quad \quad \quad \quad \quad \quad \quad \quad \quad \\ \text{NH}_2 \quad \quad \quad \text{O} \quad \quad \quad \text{NH}_2 \end{array}$	Acacia-Arten	63	
L-Djenkolsäuredisulfoxid $\begin{array}{c} \text{HOOC} - \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{S} - \text{CH}_2 - \text{S} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\ \quad \quad \quad \quad \quad \quad \quad \quad \quad \\ \text{NH}_2 \quad \quad \quad \text{O} \quad \quad \quad \text{NH}_2 \end{array}$	Acacia-Arten	63	
N-Acetyl-L-Djenkolsäuresulfoxid $\begin{array}{c} \text{HOOC} - \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{S} - \text{CH}_2 - \text{S} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\ \quad \quad \quad \quad \quad \quad \quad \quad \quad \\ \text{NH} - \text{C} - \text{CH}_3 \\ \quad \quad \quad \text{NH}_2 \\ \text{O} \end{array}$	Acacia-Arten	63	

Chemical structure	Botanical name	Number	Family
	<i>Allium cepa</i> L.	83	Liliaceae
	<i>Undaria pinnatifida</i> <i>Chondria crassicaulis</i>	75 35	Phaeophyceae Rhodophyceae
	<i>Allium cepa</i> L.	86	Liliaceae
	<i>Allium cepa</i> L. <i>Santalum album</i> L.	81 36	Santalaceae
	<i>Allium sativum</i> L.	82	Liliaceae

γ -L-Glutamyl-S-(propen-1-yl)-cysteinyl- S-(propen-1-yl)-L-Cysteinsulfoxid $\text{HOOC}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\underset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{C}}}-\text{NH}-\underset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{C}}}-\text{CH}_2-\underset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{C}}}-\text{S}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_3$ $\text{C}-\text{NH}-\text{CH}_2-\underset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{C}}}-\text{S}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_3$ COOH	Allium schoenoprasum L.	39
γ -L-Glutamyl-L-Djenkolsäuresulfoxid $\text{HOOC}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\underset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{C}}}-\text{NH}-\underset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{C}}}-\text{CH}_2-\underset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{C}}}-\text{S}-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	Acacia georginae F.M.BAILEY	33
γ -L-Glutamyl-3-(Methylthiomethyl-sulfinyl)-L-Alanin [γ -Glutamyl-Marasmin] $\text{CH}_3-\underset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{S}}}-\text{CH}_2-\underset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{C}}}-\text{S}-\text{CH}_2-\underset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{C}}}-\text{NH}-\underset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{C}}}-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	Marasmius alliaceus JACQ. Marasmius prasiomus FR. Marasmius scorodonioides QUEL.	Basidiomycetae
Lentininsäure $\text{CH}_3-\underset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{S}}}-\underset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{C}}}-[\underset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{C}}}_3\text{H}_6\text{O}_2\text{S}_2]-\underset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{C}}}-\text{S}-\text{CH}_2-\underset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{C}}}-\text{NH}-\underset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{C}}}-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	Lentinus edodes (BERK.) SINGER ⁺⁺	90
γ -Glutamyl-Collybin $\text{CH}_3-\underset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{S}}}-\underset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{C}}}-\text{CH}_2-\underset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{C}}}-\text{S}-\text{CH}_2-\underset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{C}}}-\text{S}-\text{CH}_2-\underset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{C}}}-\text{NH}-\underset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{C}}}-\text{CH}_2-\underset{\text{COOH}}{\text{CH}}-\text{COOH}$ NH_2	Collybia hariolorum QUEL. Micromphale perforans (HOFFM. ex. FR.) S.F. GRAY	20 20
	+) Neue Resultate im Druck. ++) Neue Resultate im Druck.	

3.4. Aufbauende Enzyme

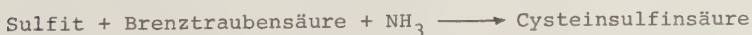
Die wichtigsten natürlichen S-Aminosäuren sind das L-Cystein und L-Methionin. Sie sind am Aufbau von Proteinen beteiligt und sind essentiell, d. h. Methionin muß mit der Nahrung aufgenommen werden, da der menschliche Organismus nicht in der Lage ist, anorganischen Schwefel in organische Verbindungen einzubauen.

Sie sind außerdem Vorstufen wichtiger Coenzyme, wie "aktives Methionin", Coenzym A und Glutathion.

Cystein und Methionin sind ineinander überführbar nach dem Schema: Cystein + Homoserin $\rightleftharpoons$ Cystathionin $\rightleftharpoons$ Homocystein + Serin. Verschiedene Mikroorganismen (*Thiobacillus dentrificans*, *Neurospora crassa*) und Hefen sind in der Lage, anorganischen Schwefel zu metabolisieren und Sulfat zu reduzieren. Aus Sulfat und ATP entsteht zunächst unter Mitwirkung des Enzyms ATP-Sulfurylase Adenosyl-5'-Phospho-Sulfat (APS), das durch das Enzym APS-Kinase und ATP zu 3'-Phospho-Adenosyl-5'-Phospho-Sulfat (PAPS) aktiviert wird. Letztere Verbindung wird auch als "aktives Sulfat" bezeichnet, da die Sulfatgruppe in energiereicher Form vorliegt und unter Beteiligung von Sulfotransferasen auf geeignete Akzeptor-Substanzen übertragen werden kann²⁴. Die dabei gebildeten Sulfatester spielen als Bausteine eine wichtige Rolle (Agar-Agar, Chondromucoide etc.). Sie sind auch in vielen sekundären Pflanzenstoffen enthalten (Flavonsulfatester, Glucosinolate) und haben überdies bei Entgiftungsprozessen sehr große Bedeutung (Sulfatester von Phenolen und Steroiden etc.).

PAPS kann in Gegenwart von NADH bzw. NADPH und unter Mitwirkung von Reduktasen über Sulfit, Thiosulfat zu H₂S (und letztlich sogar bis zu S) metabolisiert werden.

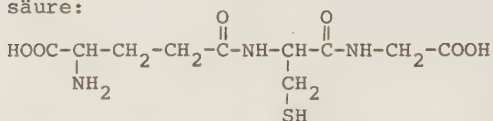
Einige Hefen und Mikroorganismen sind wiederum in der Lage, Sulfit und H₂S direkt in organische Bindung zu überführen, wobei folgende Reaktionen als die wichtigsten aufgeführt seien:



Solche und analoge Einbauprozesse (z. B. $\text{CH}_3\text{SH} + \text{Serin} \rightleftharpoons \text{S-Methyl-L-Cystein}$) konnten in verschiedenen Mikroorganismen nachgewiesen werden, spielen aber auch in höheren Pflanzen eine große Rolle, wie am Beispiel der Biogenese von Glucosinolaten (z. B. von Sinigrin in *Armoracia laphathifolia*) gezeigt wurde⁵⁷.

Der Einbau von H_2S und Mercaptanen (Alkylthiolen) in Serin verläuft wahrscheinlich über O-Acetyl-L-Serin als aktivierter Form des Serins²⁴.

Gluthation, ein Tripeptid aus Glycin, Cystein und Glutaminsäure:



nimmt eine Schlüsselstellung im Aminosäurestoffwechsel ein. Es wurde in vielen Lebewesen nachgewiesen und dient dort als Cofaktor für enzymatische Reaktionen, z. B. als Cofaktor bei Isomerase-Enzymen. Auch als Substrat für die γ -Glutamylübertragung spielt es eine Rolle. Nach MEISTER⁴² ist Glutathion die wichtigste Substanz beim Transport der Aminosäuren und Peptide. Seine Funktionen sind vor allem im tierischen und menschlichen Organismus erforscht worden, und dort hauptsächlich an Erythrozyten. Hier dient Glutathion als Oxidationsschutz für Makromoleküle²⁴:



Seine Funktion als Transportstoff der in ihm enthaltenen Aminosäuren im Blut wird diskutiert. Seine Bedeutung beim transmembranären Aminosäuretransport geht aus Teilergebnissen hervor, die sich in folgendem Cyclus zusammengefaßt bei MEISTER⁴² finden:

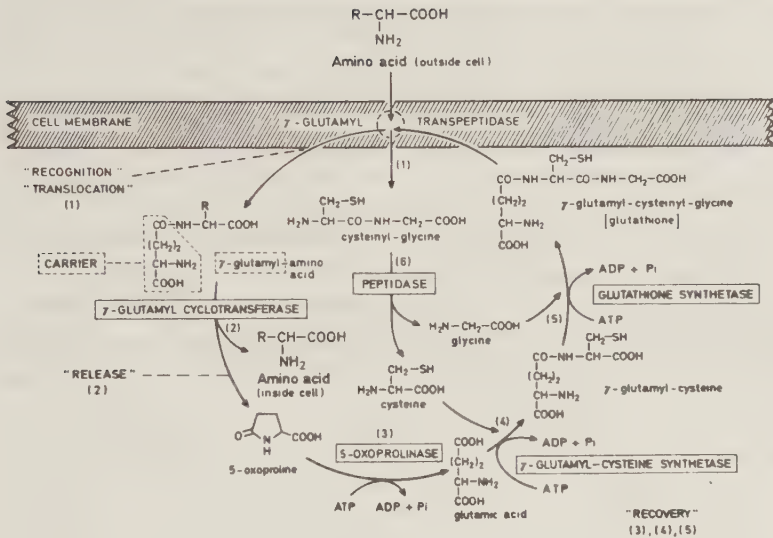


Abb. 6 : Der γ -Glutamylcyclus

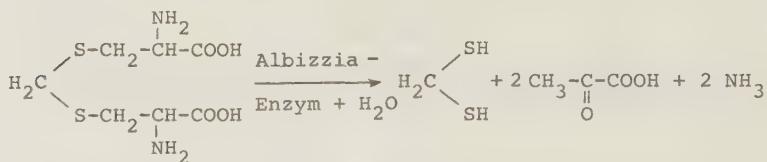
Aus dem γ -Glutamylcyclus geht außerdem hervor, daß die γ -Glutamyltranspeptidase eine wichtige Stellung bei der Bildung und beim Abbau von Peptiden einnimmt.

3.5. Abbauende Enzyme

Bei der Fäulnis von Fleisch oder Eiweiß, an der verschiedene Mikroorganismen beteiligt sein können, beobachtet man häufig die Bildung von H_2S . Durch Proteasen sowie Aminopeptidasen und Carboxypeptidasen werden aus den Proteinen zunächst die freien Aminosäuren, darunter auch Cystein, gebildet. Cystein wird dann im weiteren Verlauf durch eine Cystein-C-S-Lyase (EC 4.4.1.1.) in H_2S , Brenztraubensäure und Ammoniak gespalten.

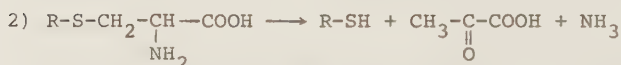
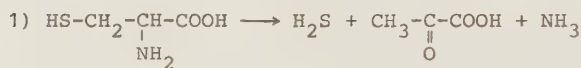
ber die Auffindung einer hochaktiven C-S-Lyase mit breitem Substratspektrum im Endosperm der Samen von Albizzia lophantha Benth. berichteten 1957 GMELIN¹⁶ und Mitarbeiter. Diese C-S-Lyase spaltet L-Djenkolsäure, das in den Samen enthaltene

natürliche Substrat, in das stark nach Zwiebeln riechende Methylendithiol, Brenztraubensäure und Ammoniak.

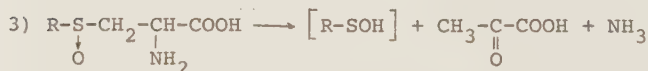


Dieses Enzym scheint auch an der oft bei Mimosaceen-Arten beobachteten Geruchsbildung in der Wurzelregion beteiligt zu sein. Studien über Substratspezifitäten und allgemeine Enzymeigenschaften wurden von GMELIN und Mitarbeitern¹⁶, von SCHWIMMER und KJAER⁶¹ und anderen⁶² beschrieben.

Folgende Substrate werden durch die Albizzia C-S-Lyase gespalten:



$\text{R} = \text{CH}_3\text{-}, \text{C}_2\text{H}_5\text{-}, \text{CH}_2=\text{CH-CH}_2\text{-}, \text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}, \text{Benzyl-}, \text{Furfuryl- etc.}$



L-Djenkolsäure, das natürliche Substrat, wird von Albizzia C-S-Lyase am raschesten gespalten, während z. B.S-(β-Carboxy-äthyl)-L-Cystein und S-(β-Carboxyisopropyl)-L-Cystein nur langsam angegriffen werden.

Andere Mimosaceen-Arten wiederum, die letztgenannte natürliche S-Aminosäure oder Dichrostachinsäure enthalten, scheinen C-S-Lyasen zu besitzen, die bevorzugt solche arteigenen Substrate angreifen können⁴⁰.

In *Pseudomonas cruciviae* wurde 1963 von NOMURA und Mitarbeitern⁴⁶ eine S-Alkyl-L-Cystein C-S-Lyase gefunden, die auch S-Alkyl-L-Cysteinsulfoxide angreift und somit Verwandtschaft zur Albizzia C-S-Lyase aufweist. Es sei an dieser Stelle vorweggenommen, daß die folgenden Untersuchungen an höheren Pilzen, genauer gesagt an *Marasmius scorodionius* QUEL., *Marasmius alliaceus* JACQ. und *Marasmius prasiosmus* FR., zur Entdeckung einer neuen Pilz C-S-Lyase geführt haben, die in ihrem Substratspektrum auffallend mit der Albizzia C-S-Lyase übereinstimmt, worüber unter "Ergebnisse" und "Diskussion" noch eingehend berichtet werden soll.

Eine in ihrem Substratspektrum auf S-Alkyl-L-Cysteinsulfoxide begrenzte C-S-Lyase, die nach ihrem natürlichen Substrat Alliin als Alliinase bezeichnet wurde, fanden STOLL und SEEBECK⁶⁵ 1947 in den Zwiebeln von *Allium sativum* (Knoblauch).

Japanische Autoren konnten ein ähnliches Enzym auch in verwandten *Allium*-Arten wie *Allium ursinum*, *Allium schoenoprasum*, *Allium porrum*^{67,68} etc. nachweisen, während KUPIECKI und VIRTANEN³⁴ in *Allium cepa* eine spezifische C-S-Lyase fanden, die das arteigene Substrat S-Propenyl-L-Cysteinsulfoxid in Brenztraubensäure, Ammoniak und $\text{CH}_3\text{-CH=CH-S=O}$, den Tränenreizstoff der Küchenzwiebel, spaltet. Auch in *Thulbaghia* und verwandten Arten wurden Alliinase-ähnliche C-S-Lyasen durch JACOBSEN und Mitarbeiter²⁹ nachgewiesen und beschrieben. In *Brassica oleracea* -Arten kommt S-Methyl-L-Cysteinsulfoxid neben verschiedenen Glucosinolaten als chemotaxonomische "Leitsubstanz" vor²⁵. Wie SCHWIMMER und MAZELIS⁶² zeigen konnten, wird S-Methyl-L-Cysteinsulfoxid ebenfalls in der Frischpflanze von einer entsprechenden C-S-Lyase begleitet, die es zum scharfschmeckenden $\text{CH}_3\text{-S-S-CH}_3$, Brenztraubensäure und Ammoniak spaltet.



Legt man Kristalle von L-Cystein oder S-Alkyl-L-Cysteinen auf die Zungenoberfläche, so kann man nach einiger Einwirkungszeit deutlich den anhaltenden Geschmack von H_2S bzw. R-SH beobachten. Dieses Phänomen wurde schon von BINKLEY an S-2-Phenyläthyl-L-Cystein beobachtet und beschrieben⁹⁴. Es deutet darauf hin, daß im Zungengewebe - eventuell im Bereich der Geschmacksnerven - C-S-Lyasen vom Typ EC 4.4.1.1. vorkommen.

Nähere Untersuchungen über dieses geschmacksphysiologisch an sich wichtige und interessante Enzymsystem scheinen jedoch noch nicht vorzuliegen.

Nach internationalen Nomenklaturvorschlägen für Enzyme (JUB Nomenklatur) werden C-S-Lyasen unter den Code-Nummern EC 4.4.1.1.-4.4.1.6. geführt und spezifiziert:

Beispiele:

Alliin-Lyase 4.4.1.4.⁶⁶

S-Alkylcystein-Lyase 4.4.1.6.⁴⁶

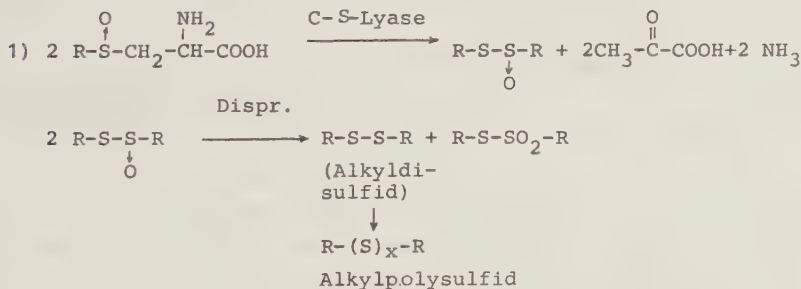
IV. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

H A U P T T E I L

4.1. Ermittlung der Eigenschaften des Geruchs-Precursors von Marasmius-Arten durch DC- und PC-Vorproben

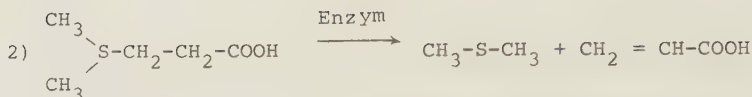
Als lauchartig riechend sind in der chemischen Literatur verschiedene Stoffgruppen beschrieben. Gelber Phosphor und Phosphorwasserstoff-Verbindungen weisen einen unangenehm an Knoblauch erinnernden Geruch auf. Auch organische Arsenverbindungen, die durch Metabolisierung anorganischer Arsenverbindungen (z. B. Schweinfurter Grün als Tapetenfarbe) durch Schimmelpilze gebildet werden (CHALLENGER⁶), besitzen lauchartigen Geruch. Besonders häufig sind jedoch solche Geruchsnoten unter den Schwefelverbindungen zu finden.

Alkanthiole, Alkylthioäther sowie Alkyldisulfide und Alkylpolysulfide sind die markantesten Vertreter dieser Schwefelverbindungen. Sie werden häufig im Pflanzenreich als Sekundärstoffe, gebildet aus Precursors, angetroffen:

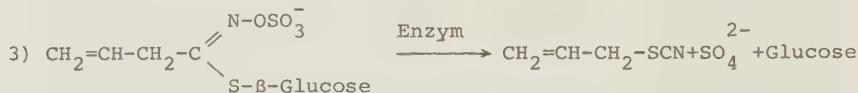


R = Allyl-, Propyl-, Methyl-

Beim Knoblauch entstehen nach 1) zunächst enzymatisch drei verschiedene Alkylthiosulfinsäurealkylester, mit R=Allyl-, Propyl- und Methyl-, aus denen dann später durch Austausch und Disproportionierung gemischte Disulfide und Polysulfide gebildet werden. Solche komplexen Gemische liegen im Knoblauchöl und in *Asa foetida*⁹³ vor. In der Alge *Polysiphonia fastigiata* werden enzymatisch aus 3-S-(Dimethyl)-thiopropionsäure (Propiothetin) Dimethylsulfid und Acrylsäure gebildet⁶.

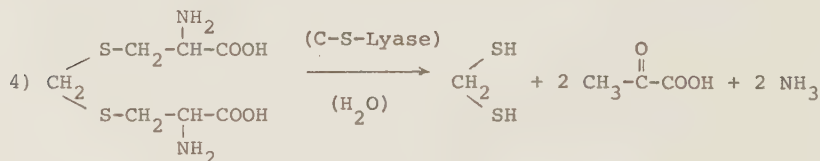


Bei einigen Brassica-Arten (*Thlaspi arvense* und *Alliaria officinalis*) tritt eine abnormale enzymatische Spaltung von Sini-grin auf. Das hierbei gebildete Allylrhodanid riecht ebenfalls stark nach Knoblauch²².



Einen besonders markanten Knoblauch-Zwiebelgeruch beobachtet man an den Wurzelballen von Mimosaceen-Arten (z. B. *Mimosa pudica*) sowie bei angefeuchteten Endospermpulver der Samen von *Albizzia lophantha* Benth. oder *Acacia farnesiana* (L.) Wild.

Wie GMELIN und Mitarbeiter¹⁶ zeigen konnten, wird hierbei L-Djenkolsäure als natürliches Substrat von einem spezifischen Enzym, einer C-S-Lyase, in Methylendithiol, Brenztraubensäure und Ammoniak gespalten.



Wie die Geruchsentwicklung erkennen läßt, scheint Methylendithiol weitere Folgeprodukte mit starker Geruchsnote zu bilden. Eingehende Untersuchungen über die chemische Natur solcher Umwandlungsprodukte stehen noch aus.

Da der Geruch von *Marasmius alliaceus* JACQ., *Marasmius prasiosmus* FR. und *Marasmius scorodoni* QUEL. auffallend an den soeben erwähnten Geruchstyp erinnert, wurde in der Pilzextraktion mit spezifischen Schwefelreagentien nach möglichen Precursor-Substanzen gesucht. Um die genuinen Precursors erfassen zu können, wurden die Pilzextrakte so hergestellt, daß enzymatische Prozesse nach Möglichkeit ausgeschlossen wurden. Dies gelang 1. durch Einbringen des Pilzpulvers in die 5-10-

fache Menge kochenden Wassers und kurzes Aufkochen oder 2. durch wiederholtes Aufkochen des Pulvers mit 60-70 proz. Methanol. Bei 1. gingen beträchtliche Mengen störender Schleimstoffe in Lösung, bei 2. konnte erst nach wiederholter Extraktion der Precursor quantitativ extrahiert werden. Einbringen des Pilzpulvers in die 5fache Menge kochenden Wassers, kurzes Kochen und anschließende Zugabe des gleichen Volumens Methanol, um gelöste Schleimstoffe zu fällen, erwies sich schließlich als optimale Extraktionsmethode.

5 μ l Filtratlösung wurden auf DC-Platten Kieselgel 254 Alufolie Merck oder Cellulose Alufolie Merck bzw. 20 μ l Filtratlösung wurden auf MN-214 Filterpapiere aufgetragen. Die Entwicklung erfolgte im Fließmittel n-Butanol/Essigsäure/Wasser (4:1:1), (Fließmittel A), oder besser, um die Rf-Werte des sehr polaren Precursors zu erhöhen, im Fließmittel n-Butanol/Essigsäure/Wasser/Isopropanol (8:2:5:3), (Fließmittel B).

Nach Entwicklung und Trocknung wurden die DC-Folien bzw. PC-Bögen in Längsstreifen geschnitten. Jeder Längsstreifen wurde mit einer spezifischen Reagenzlösung angesprüht.

- a) K_2PtJ_6 -Reagenz (nach KOLB und TOENNIS) +; langsame Entfärbung der Precursor-Flecken
- b) $KMnO_4$ -Reagenz +; rasche Entfärbung der Precursor-Flecken
- c) $AgNO_3-NH_4OH$ -Reagenz (nur für PC)
zweimaliges Besprühen, zweimaliges Erhitzen auf 120°C;
für 10 Minuten, Auswaschen der PC-Streifen in verdünnter HNO_3 -Lösung (1 %) und Trocknen unter Lichtausschluß +;
(dunkelgraue Precursor-Flecken auf beigem Hintergrund).

Dieses Reagenz wurde ursprünglich von SCHULTZ und GELIN⁶⁰ für Glucosinolate entwickelt. Wie von uns in nicht publizierten Studien an S-haltigen Mimosaceen-Aminosäuren und an verschiedenen Alkylcysteinsulfoxiden festgestellt wurde, eignet sich dieses Reagenz gleich gut für den empfindlichen Nachweis von S-Alkylcysteinen und S-Alkylcysteinsulfoxiden.

- d) Ninhydrin, +; (unter der großen Anzahl von Marasmius-Aminosäuren hob sich der Precursor auf Kieselgel-DC-Platten durch seine ziegelrote Färbung hervor).

- e) Mit Jod-Azid-Lösung, die vor allem auf SH-Verbindungen anspricht, konnte nur eine sehr schwach positive Reaktion erzielt werden.

Durch diese Sprühreagentien ließ sich im System A (Kieselgelplatten) bei Rf 0,04 im System B bei Rf 0,06 eine S-haltige Substanz ermitteln (Reag.a) und c)), die zusätzlich KMnO_4 entfärbte und mit Ninhydrin positiv reagierte. Diese Substanz war, wie später gezeigt wird, mit dem gesuchten Geruchs-Precursor identisch. Zweidimensionale PC und DC (1. Richtung System A oder System B, 2. Richtung System C (Phenol/Wasser) oder System D (Isopropanol/10 proz. NH_4OH -Lösung 7+3) ermöglichten eine gute Auftrennung der Begleit-Aminosäuren.

4.2. DC-Elektrophorese

Zur DC-Analyse wurden die Extraktlösungen der Pilze *Marasmius alliaceus* JACQ., *Marasmius scorodoni* QUEL. und *Marasmius prasiosmus* FR. auf DC-Platten Cellulose Macherey u. Nagel und DC-Platten Kieselgel (CAMAG) aufgetragen. Als Vergleichslösungen dienten 1. Glutaminsäure, 2. Asparaginsäure, 3. Glutathion, 4. S-(β -Carboxyäthyl)-L-Cystein, 5. S-(β -Carboxyisopropyl)-L-Cystein, 6. Dichrostachinsäure, 7. Histidin, 8. Arginin, 9. Lysin, 10. Glycin, 11. β -Alanin, 12. γ -Aminobuttersäure.

Die Platten wurden entweder mit $\text{m}/30$ Phosphat-Puffer pH 6,5 oder mit Pyridin-Acetatpuffer pH 4,9 besprüht. Die Elektrophorese erfolgte in einem CAMAG-DC-Elektrophoresegerät unter Wasserkühlung bei 600-900 V und 20-40 mA für 30 Minuten. Die Flecken wurden 1.) durch K_2PtJ_6 -Reagenz ohne Erhitzen, 2.) durch Ninhydrin-Reagenz und Erhitzen auf 110°C sichtbar gemacht.

Abb. 7 und Abb. 8 bringen die Ergebnisse der DC-Elektrophoresen.

Wie die Ergebnisse der DC-Elektrophoresen erkennen lassen, handelt es sich bei der S-haltigen Precursor-Substanz der drei Pilzextrakte um eine anionische Verbindung, also um eine Säure. Sie wandert wie Glutathion, etwas langsamer als Glutaminsäure.

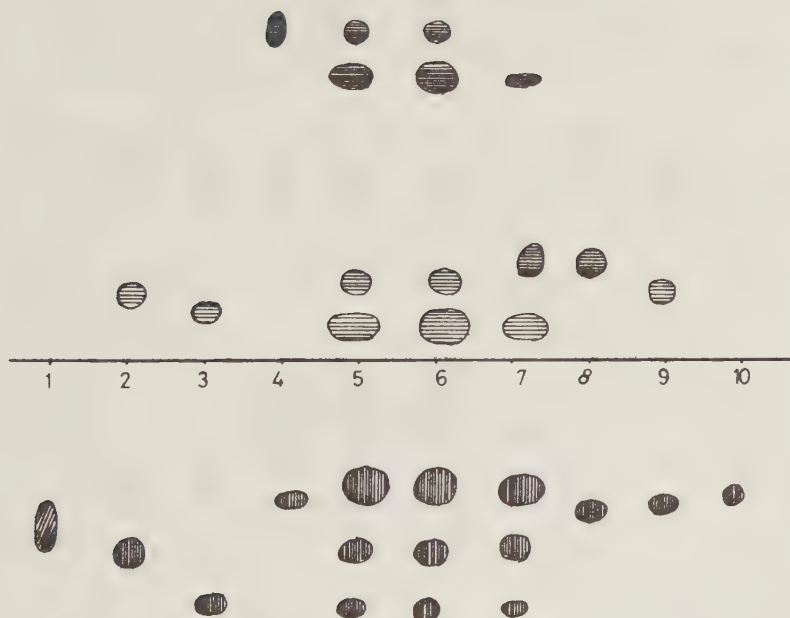


Abb. 7: DC-Elektrophorese von Auszügen aus *Marasmius scorodonium* QUEL. 5, *Marasmius alliaceus* JACQ. 6., *Marasmius prasioides* FR. 7 bei 900 V, 30 mA, Pyridin-Puffer pH 4,9 auf Cellulose-Platten
Vergleichssubstanzen: Pikrinsäure (1); Arginin, Glutaminsäure (2); Histidin, Asparaginsäure (3); Lysin, Glutathion (4); γ -Aminobuttersäure, Dichroastachinsäure (8); β -Alanin, S-(β -Carboxyisopropyl)-L-Cystein (9); S-(β -Carboxyäthyl)-L-Cystein (10);
Sprühreagenz: Ninhydrin



Abb. 8: DC-Elektrophorese von Auszügen aus *Marasmius scorodonium* QUEL. 5, *Marasmius alliaceus* JACQ. 6, *Marasmius prasiosmus* FR. 7, bei 700 V, 20 mA, 30 Min.,
^m/30 Phosphat-Puffer pH 6,5 auf Cellulose-Platten

Vergleichssubstanzen: Pikrinsäure (1); Arginin, Glutaminsäure (2); Histidin, Asparaginsäure (3); Lysin, Glutathion (4); γ -Aminobuttersäure, Dichroastachinsäure (8); β -Alanin, S-(β -Carboxyisopropyl)-L-Cystein (9); S-(β -Carboxyäthyl)-L-Cystein (10);
 Sprühreagenz: Ninhydrin

Laut PC, DC und DC-Elektrophorese ist die Precursor-Substanz in allen drei Pilz-Extrakten identisch (gleiche Rf-Werte und Laufstrecken).

4.3. Vorprüfung auf Beteiligung enzymatischer Prozesse bei der Geruchsbildung in den drei Pilzarten Marasmius alliaceus JACQ., Marasmius praiosmus FR. und Marasmius scorodonius QUEL.

Verrührt man die Pilzpulver von Marasmius alliaceus JACQ., Marasmius praiosmus FR. und Marasmius scorodonius QUEL. mit 10 Vol. ^m/15 Phosphatpuffer pH 8, so beobachtet man nach einigen Minuten zunehmende Bildung des charakteristischen Zwiebel-Knoblauchgeruchs, der deutlich an den von Methylendithiol erinnert.

Werden diese Ansätze in Zeitabständen neben den oben beschriebenen Extraktlösungen aufgetragen und einer DC, PC oder DC-Elektrophorese unterworfen, so beobachtet man kontinuierliche Abnahme der Precursor-Substanz und kontinuierliche Zunahme von Brenztraubensäure, die sich im DC, PC und bei DC-Elektrophorese durch spezifische Reagentien nachweisen läßt.

Nachweisreaktionen für Brenztraubensäure:

1. o-Phenyldiamin/Trichloressigsäure $\longrightarrow$ blaue Fluoreszenz nach kurzem Erhitzen auf 100°C
2. 2,4-Dinitrophenylhydrazin-HCl-Reagenz $\longrightarrow$ orangefarbene Flecken
3. K₂PtJ₆-Reagenz $\longrightarrow$ langsame Entfärbung.

Gleichzeitig beobachtete man auch zunehmende Fleckengröße von L-Glutaminsäure.

Die beobachtete Bildung von Brenztraubensäure erinnerte an die analoge Bildung von Brenztraubensäure bei der Alliin-Spaltung durch Alliinase oder bei der L-Djenkolsäurespaltung durch Albizzia-C-S-Lyase und ließ somit die Beteiligung einer ähnlichen C-S-Lyase vermuten.

Die Zunahme von Glutaminsäure in den Pilzpulver-Pufferansätzen gab Anhaltspunkte für die Anwesenheit eines Enzyms vom Typ der Glutamylpeptidasen, insbesondere einer γ -Glutamyl-

transpeptidase, die von LEVENBERG¹³ z. B. im Basidiomyceten-Pilz, *Agaricus bisporus*, nachgewiesen worden war.

Durch Inkubieren der drei Pilzpulver mit verschiedenen Substanzen wurde deshalb versucht, die hier beobachteten Fakten genauer festzulegen und zu klären, d. h. die beteiligten Enzyme näher zu charakterisieren.

4.3.1. Vorproben auf das Vorkommen von C-S-Lyasen in den drei Pilzarten

1 Teil Pilzpulver von *Marasmius alliaceus* JACQ., *Marasmius prasiosmus* FR. und *Marasmius scorodionius* QUEL. wurde mit 10 Teilen ^m/15 Phosphatpuffer pH 8 angerührt. Portionen à 2 ml wurden mit je 10-50 mg folgender C-S-Lyase-Substrate versetzt:

S-Methyl-L-Cystein, S-Äthyl-L-Cystein, S-Propyl-L-Cystein, S-Allyl-L-Cystein, S-Benzyl-L-Cystein und L-Djenkolsäure.

Die Inkubationslösungen wurden bei 37°C gehalten und in Zeitabständen organoleptisch geprüft. Bei den Alkylcysteinen konnte deutlich zunehmende Bildung der entsprechenden Alkylthiole durch ihren charakteristischen Geruch erkannt werden. Besonders ausgeprägt war die Alkylthiol-Bildung bei *Marasmius scorodionius* QUEL. und *Marasmius prasiosmus* FR. Bei *Marasmius alliaceus* JACQ. war sie erst nach 1-2 Stunden deutlich wahrnehmbar.

Die gebildeten R-SH-Verbindungen wurden durch Zugabe von 7-Chlor-4-nitro-benzofurazan mit den Reaktionsmischungen in die entsprechenden Derivate überführt, die sich durch DC als gelbe Fluoreszenzflecken nachweisen ließen und mit synthetischen Vergleichspräparaten identische Rf-Werte aufwiesen.

4.3.1.1. Gelfiltration der Rohenzymlösungen

Da die Pilzpulver-Puffergemische auf Grund des vorhandenen Geruchsprecursors und seiner Autolyse Produkte einen starken Eigengeruch aufwiesen, der diese organoleptischen Tests stören konnte, wurden Pilzpulver-Puffer (1:5)-Ansätze nach 15 Minuten abgepreßt.

Die stark riechenden Filtrate wurden in üblicher Weise auf eine Säule mit Sephadex G 25 gebracht. Beim Nachwaschen mit Phosphatpufferlösung pH 8 erhielt man durch Gelfiltration eine schwach bräunlich gefärbte, völlig geruchlose Proteinfraction, die gleichzeitig auch die gesamten Enzyme enthielt.

4.3.1.2. Prüfungen mit den Gelfiltraten (geruchlose Pilzenzymlösungen)

Wiederholung des Vorversuchs mit gelfiltrierten Pilzenzym Lösungen gegen verschiedene Substrate ergab wieder deutlich organoleptisch und chemisch nachweisbare Bildung von R-SH-Derivaten.

In den einzelnen Ansätzen konnte NH_3 mit Neßlers-Reagenz nach Mikrodifffusion in Conway-Gefäßen nachgewiesen werden. Brenztraubensäure fiel nach Zugabe von 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Reagenz als gelbes Hydrazon aus. Nach Umkristallisieren aus Eisessig hatte es einen Schmelzpunkt Fp : $215-216^\circ\text{C}$.

4.3.1.3. Prüfung der gelfiltrierten Pilzenzymlösungen mit S-Alkyl-L-Cysteinsulfoxiden auf C-S-Lysen

Wie oben wurden 10-50 mg der S-Alkyl-Cysteinsulfoxide (Alkyl = CH_3- , C_2H_5- , C_3H_7- , Allyl-, Benzyl-) pro 2 ml Rohenzymlösung zugesetzt. Nach 1-2 Stunden beobachtete man in allen Ansätzen auf der Zunge den brennend scharfen Geschmack der gebildeten Spaltprodukte R-S-S-R.



Bei Benzyl-L-Cysteinsulfoxid setzte nach längerer Zeit Kristallisation des schwerlöslichen Benzyl-S-S-Benzyl ein, das



brennend scharf schmeckte und bei $81-83^\circ\text{C}$ schmolz.

Nach Stehen über Nacht lagerten sich die anfangs geruchlosen Spaltprodukte in die charakteristisch riechenden Di- und Polysulfide um.

Brenztraubensäure und Ammoniak wurden wie oben nachgewiesen.

4.3.2. Vorproben auf das Vorkommen von γ -Glutamyltranspeptidasen in den drei Marasmius-Arten

Pilzextrakte (Herstellung siehe oben) wurden zu 2 ml gelfiltrierter Rohenzymlösung von Albizzia lophantha in Phosphat-Puffer pH 8 gegeben. Auch nach längerem Stehen wurde kein typischer Zwiebel-Knoblauchgeruch wahrgenommen. Dies war um so verwunderlicher, als Albizzia lophantha eine C-S-Lyase besitzt, die ein sehr breites Wirkungsspektrum aufweist.

Die Vorversuche mit den in Phosphat-Puffer pH 8 verrührten Pilzpulvern hatten einerseits eine Abnahme des Geruchsprecursors, andererseits aber gleichzeitig eine Zunahme von Glutaminsäure gezeigt. Hieraus und aus der fehlenden Geruchsbildung nach Inkubation der Pilzextrakte mit Albizzia C-S-Lyase ergab sich ein Hinweis, daß γ -Glutamyltranspeptidasen an der Spaltung des Precursors und somit an der Bildung des typischen Geruchs beteiligt sein müssen. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurde eine Rohenzymlösung von Agaricus bisporus mit der geruchlosen Albizzia lophantha Enzymlösung und dem darin befindlichen Geruchsprecursor der Pilze gemischt. Es trat die erwartete Geruchsbildung auf.

Da Albizzia lophantha keine γ -Glutamyltranspeptidase besitzt, wohl aber Agaricus bisporus¹³, wurde nach diesem Versuch deutlich, daß die Geruchsbildung in zwei enzymatischen Reaktionsschritten verläuft. Im ersten Schritt wird die Peptidbindung durch eine γ -Glutamyltranspeptidase gespalten und im zweiten Schritt greift die C-S-Lyase das freigesetzte Cysteinderivat an.

4.3.2.1. Prüfung der gelfiltrierten Pilzenzymlösungen auf γ -Glutamyltranspeptidasen durch DC und PC

Bei Tests der gelfiltrierten Pilzenzymlösungen in Tris-Citrat-Puffer pH 8,5 mit verschiedenen Substraten (Glutathion und γ -Glutamyl-4-Nitroanilid) ließ sich deutlich die Bildung von Glutaminsäure beobachten. Werden diese Ansätze in Zeitabständen neben den Substratkontrollen aufgetragen und einer Dünn-

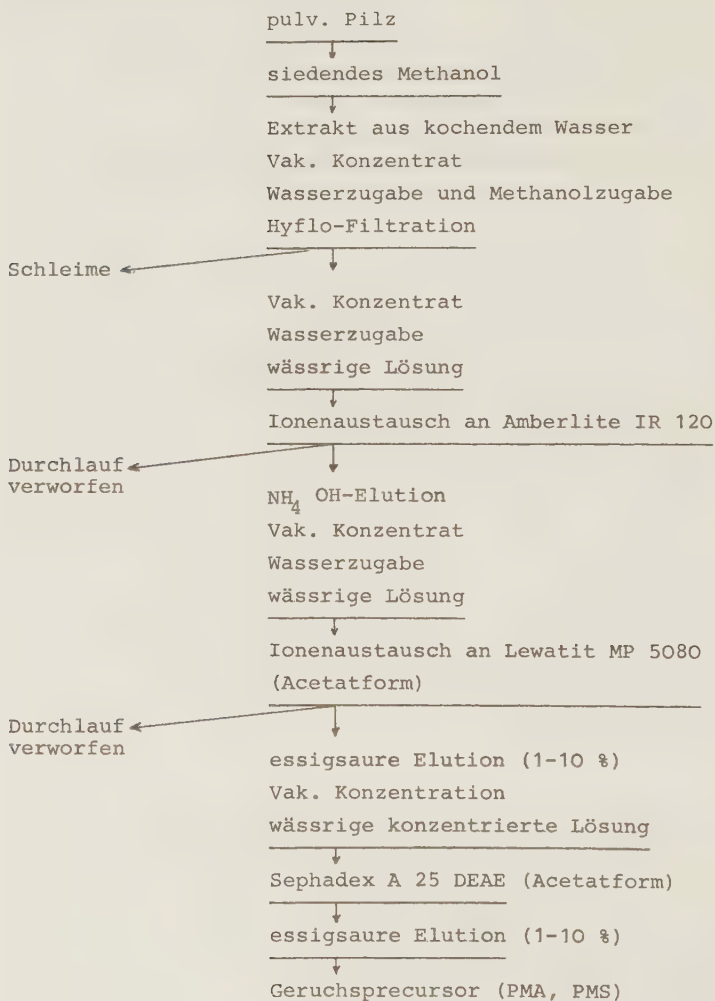
schichtchromatographie oder Papierchromatographie unterworfen, so beobachtet man nach einiger Zeit die kontinuierliche Abnahme der Substrate (schneller bei γ -Glutamyl-4-Nitroanilid) und kontinuierliche Zunahme von Glutaminsäure. Da nach THOMPSON⁷³ die enzymatischen Reaktionen bei Zugabe von L-Methionin oder Hydroxylamin als Akzeptor für die freigesetzte Glutaminsäure schneller ablaufen soll, wurden Ansätze wie oben mit und ohne Akzeptorsubstanzen untersucht. Die γ -Glutamyltranspeptidase wurde ganz offensichtlich durch diese Substanzen aktiviert. Die Rf-Werte der gebildeten γ -Glutamyl-derivate zeigt die Tabelle IV.

Butanol/Eisessig/Wasser/Isopropanol (8:2:5:3)				
	Rf	PC	Rf	DC
γ -Glutamyl-L-Methionin	0,39		0,22	
γ -Glutamyl-Hydroxylamin	0,13		0,09	

Tab. IV: Rf-Werte der durch γ -Glutamyltranspeptidase gebildeten γ -Glutamylakzeptoren, PC und DC

4.4. Isolierung der Geruchsprecursors aus Marasmius scorodionius QUEL. (PMS) und Marasmius alliaceus JAQ. (PMA)

Isolierungsschema zur Gewinnung der Geruchsprecursors (PMA und PMS)



Da nach den ersten Vorversuchen bekannt war, daß es sich bei dem zu isolierenden Geruchsprecursor um ein saures Peptid handelte, wurde versucht, den Precursor mit Hilfe von Ionenaustauschern anzureichern, zu reinigen und nach Möglichkeit kristallin zu erhalten. Dazu wurden 30 g *Marasmius scorodonius* QUEL. 5 mal mit je 100 ml 70 proz. Methanol extrahiert, der Extrakt im Vakuum konzentriert und nach Aufnehmen in Wasser über eine Säule mit Amberlite IR 120 geschickt. Die Ablösung vom Harz erfolgte mit 7 proz. Ammoniak. Das Eluat wurde im Vakuum eingedampft, in Wasser aufgenommen und über eine Säule mit Lewatit MP 5080 (Acetatform) geschickt. Dieses Harz soll, laut Angaben der Herstellerfirma bei einer Gradienten-Trennung sehr scharfe Trennungsergebnisse erzielen lassen. Trotz vorsichtiger Steigerung der Essigsäurekonzentrationen von 1 proz. auf 10 proz. gelang es jedoch nicht, eine einheitliche Substanz zu isolieren. Erkennbar war jedoch, daß der Precursor stark angereichert war.

Da insgesamt nur 10 mg Substanzgemisch isoliert werden konnten und eine weitere Aufarbeitung zu mühsam war, wurden erneut 100 g getrocknete Fruchtkörper von *Marasmius scorodonius* QUEL. extrahiert und der Extrakt wie oben über Ionenaustauscherharze geschickt. Bei dieser Aufarbeitung und Trennung konnten 38 mg Substanzgemisch isoliert werden, das jedoch wieder stark unreinigt war.

Um den Geruchsprecursor völlig rein zu erhalten, wurde die oben genannte, stark angereicherte Fraktion über eine Sephadex A 25 DEAE (Acetatform)-Säule geschickt. Durch Gradientenelution unter langsamer Erhöhung der Essigsäurekonzentration von 1 proz. auf 5 proz. ließ sich der Precursor frei von Verunreinigungen (Begleitstoffen) gewinnen.

Nach Umkristallisieren aus Äthanol-Wasser konnten 27 mg weiße, längliche Kristalle gewonnen werden: "PMS".

Da diese Menge von "PMS" zu gering für eine Strukturaufklärung war, wurde erneut Pilzmaterial extrahiert. Diesmal wurden 30 g Fruchtkörper von *Marasmius alliaceus* JAQQ. mit kochendem Wasser (abweichend von der vorhergehenden Methode) extrahiert.

Nach Ausfällung der Schleime durch Zugabe von Methanol wurde wieder wie oben weitergearbeitet. Diesmal konnten jedoch 247 mg des Precursors "PMA" kristallin gewonnen werden, so daß diese Extraktionsmethode als wesentlich effektiver den Vorzug verdient.

4.5. Charakteristische Daten der Geruchsprecursors PMS und PMA

Aus den Werten der Elementaranalysen errechnete sich für beide Isolate die gleiche Summenformel $C_{10}H_{18}N_2O_6S_2 \cdot 1/2 H_2O$.

Die Messungen der optischen Drehungen ergab bei beiden Substanzen den Wert $[\alpha]_D^{20} = -5,5^\circ$ ($c=0,1$; H_2O). Beide Substanzen schmolzen bei $174^\circ C$ unter Zersetzung.

4.6. Charakterisierung der Geruchsprecursors durch spektroskopische Methoden

4.6.1. Vergleich der beiden Substanzen PMS und PMA durch IR-Spektroskopie

Schon aus allen vorhergehenden chromatographischen Methoden war ersichtlich, daß in beiden Pilzen der gleiche Geruchsprecursor enthalten sein mußte. Mit den isolierten Substanzen PMS und PMA aus beiden Pilzen wurden IR-Absorptionspektren angefertigt.

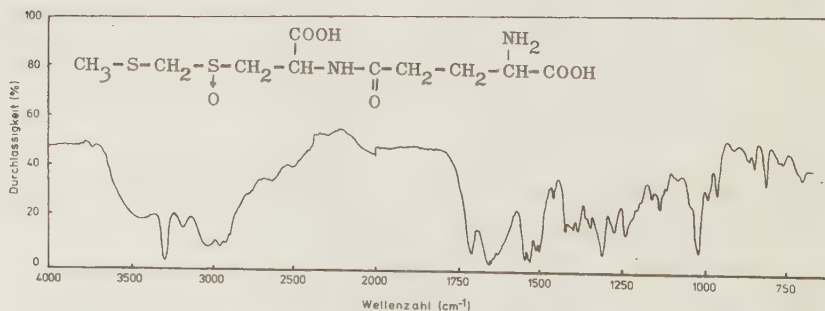


Abb. 9: IR-Absorptionsspektrum des Geruchsprecursors PMS aus *Marasmius scorodoni* QUEL.

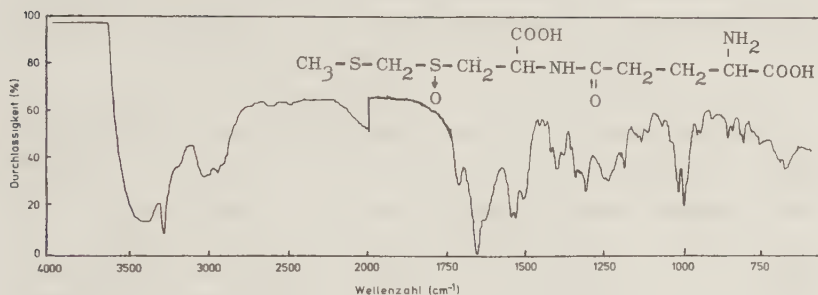


Abb. 1Q: IR-Absorptionsspektrum des Geruchsprecursors
PMA aus *Marasmius alliaceus* JAQ.

Wie Abb. 9 und 10 zeigen, ist in beiden Spektren der Kurvenverlauf im Bereich $4000-700\text{ cm}^{-1}$ identisch. Somit bestätigen auch die IR-Spektren die Identität der beiden isolierten Precursors PMS und PMA.

4.6.2. Feld-Desorptionsspektroskopie von PMS und PMA

Peptide besitzen wegen ihres stark polaren Charakters und ihres Molekulargewichtes einen außerordentlich geringen Dampfdruck, der zur Aufnahme eines normalen Massenspektrums (mindestens 10^{-5} Torr) nicht ausreicht. Da andererseits eine Erhöhung des Dampfdrucks durch Temperaturerhöhung - wegen der thermischen Labilität dieser Verbindungsklasse - ohne gleichzeitige Zersetzung nicht möglich ist, kann das Molekulargewicht mit Hilfe der herkömmlichen Ionisierungsverfahren auf massenspektroskopischem Wege nicht bestimmt werden. Daher wurde ein besonders schonendes Ionisierungsverfahren, die sogenannte Felddesorptionstechnik angewandt. Der hierbei gefundene Basispeak bei $m/e = 327$ für das $(M+1)^+$ -Ion bestätigte die Summenformel $C_{10}H_{18}N_2O_6S_2$ (Molekulargewicht 326) für beide Isolate PMS und PMA.

4.6.3. ^1H -NMR-Spektroskopie von PMS und PMA

Die ^1H -NMR-Spektren bei einer Meßfrequenz von 270 MHz in D_2O sind in Abb. 11 und 12 wiedergegeben.

Das Singulett mit der Intensität 3H bei $\delta = 2,24$ ppm muß auf Grund seiner chemischen Verschiebung einer isolierten CH_3 -Gruppe entsprechen, z. B. $\text{CH}_3\text{-S}$ oder $\text{CH}_3\text{-C}(=\text{O})$. Eine $\text{CH}_3\text{-S-}$ Gruppe kann ausgeschlossen werden, da hierfür ein Wert von $\delta^{\text{O}} = 2,70$ ppm erwartet werden muß. Da es sich bei dem vorliegenden Produkt mit großer Wahrscheinlichkeit um ein Cysteinderivat handelt, muß ein ABX-Spektrum erwartet werden, wobei die magnetische Nichtäquivalenz der beiden Methylen-Protonen des Cysteins auf dem benachbarten Asymmetriezentrum basiert (Diastereotypie).

Im Spektrum erscheint der AB-Teil bei $\delta = 3,39$ ppm und $\delta = 3,48$ ppm und der zugehörige X-Teil bei $\delta = 4,79$ ppm ($J_{\text{AB}} = 14\text{Hz}$, $J_{\text{AX}} = 11\text{Hz}$, $J_{\text{BX}} = 3,5\text{Hz}$).

Da die CH_2 -Gruppe, d. h. der AB-Teil des ABX-Spektrums, gegenüber Cystein deutlich nach tieferem Feld verschoben ist, muß in der zu untersuchenden Verbindung der Schwefel als Sulfoxid vorliegen.

Ein unabhängiges AB-Spektrum bei $\delta = 4,10$ ppm und $\delta = 4,17$ ppm mit einer Kopplungskonstanten von $J_{\text{AB}} = 14\text{ Hz}$, d. h. ein für geminale Protonen typischer Wert, entspricht somit einer isolierten CH_2 -Gruppe.

Auf Grund der chemischen Verschiebung muß diesem AB-System eine $-\text{S-CH}_2\text{-S-}$ Gruppierung zugeordnet werden, wobei beide Protonen wiederum diastereotop sind. Das zum Triplet aufgespaltene Signal bei $\delta = 3,89$ ppm mit der Intensität 1H, sowie die beiden Signale bei $\delta = 2,15$ ppm und $\delta = 2,50$ ppm (Intensität jeweils 2H) entsprechen einem Glutaminsäurerest.

Somit läßt sich das zu untersuchende Molekül in zwei Strukturen aufteilen: einen Glutaminsäureteil und ein substituiertes Cysteinderivat. Beide Reste sind durch eine Peptidbindung verknüpft, wobei die Lage der Peptidbindung aus dem Protonenspektrum nicht unmittelbar abzuleiten ist. Bei einem

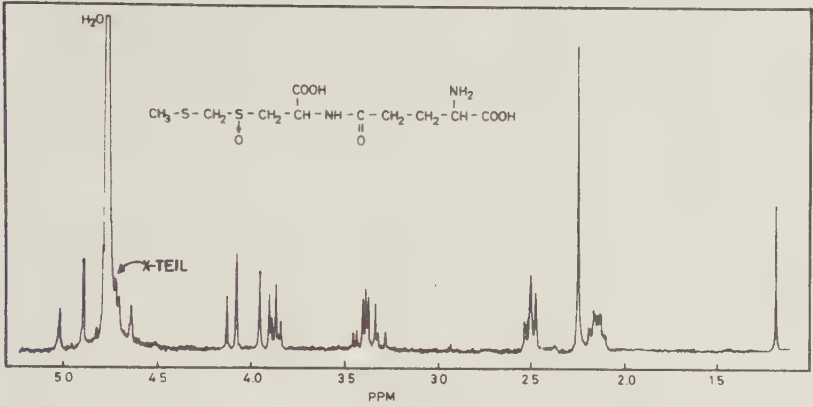


Abb. 11: 270-MHz ¹H-NMR-Spektrum von PMS in D₂O, t-BuOH
als interner Standard ($\sigma = 1,22$ ppm)

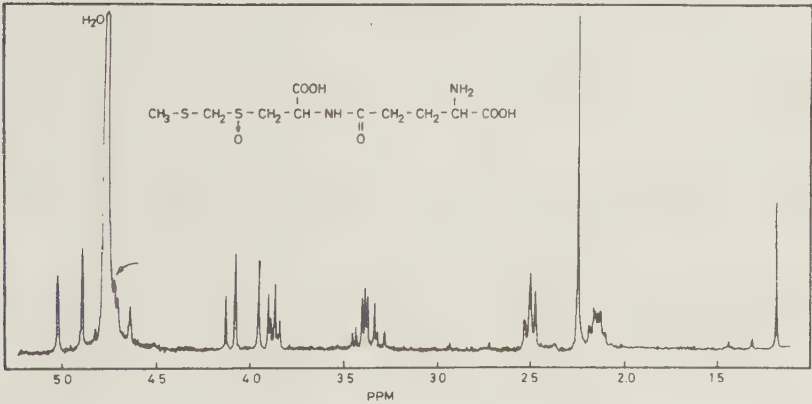


Abb. 12: 270-MHz ¹H-NMR-Spektrum von PMA in D₂O, t-BuOH
als interner Standard ($\sigma = 1,22$ ppm)

γ -Glutamylpeptid verschiebt sich das α -Proton in saurer Lösung um $\delta = 0,68$ ppm nach tieferem Feld, während in alkalischer Lösung eine Hochfeldverschiebung von $\delta = 0,35$ ppm auftritt⁵⁵. Im vorliegenden Fall wurden die entsprechenden Werte mit $\delta = 0,57$ ppm bzw. $\delta = 0,59$ ppm bestimmt.

Somit handelt es sich bei der vorliegenden Verbindung um ein γ -Glutamylderivat.

Alle übrigen Signale $\delta = 4,88$ ppm oder $\delta = 5,05$ ppm sind vermutlich nicht entkoppelte NH- oder OH-Protonen, die für die Interpretation keine Bedeutung haben.

4.6.4. ^{13}C -NMR-Spektroskopie von PMA

Neben den Protonenspektren wurde nur von PMA (wegen der geringen Menge von PMS nicht möglich) ^{13}C -Spektren in D_2O mit Dioxan als internem Standard aufgenommen.

Im Protonenrauschentkoppelten ^{13}C -Spektrum (Abb. 13) sind - neben den Signalen für 3 Carbonyl-Kohlenstoffe bei $\delta = 174,4$ - $172,9$ ppm - weitere sieben Signale von Kohlenstoffen im Bereich von $\delta = 16,1$ - $54,6$ ppm zu erkennen. Aus der Multiplizität der ^{13}C -Signale im off-resonance-Spektrum ist die Anzahl der mit den jeweiligen Kohlenstoffatomen direkt verknüpften Protonen zu erkennen. Insgesamt ergeben sich 13 Wasserstoffatome, die direkt an Kohlenstoffatome gebunden sind, so daß 5 Protonen - entsprechend der Summenformel - an Stickstoff- bzw. Sauerstoffatome gebunden sein müssen.

Das Fehlen eines Signals bei $\delta = 182$ ppm, das für die freie γ -Carboxylgruppe der Glutaminsäure zu erwarten wäre, läßt auf γ -Verknüpfung der Glutaminsäure schließen. Die Zuordnung der übrigen Signale erfolgt durch Vergleich des Spektrums mit den Daten für freie Glutaminsäure⁴, Cysteinhydrochlorid²⁷ und Cystin³⁰ (Tab. V).

Das Signal eines sekundären Kohlenstoffatoms bei $\delta = 54,6$ ppm wird dem $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{S}-$ Kohlenstoffatom zugeordnet. Aus der Änderung

$\downarrow$
O

Tab. V:

Cystein-HCl	55,7	27,4	171,95		
	CH	CH ₂	COOH		
	α	β	α		
freie Glutamin-säure	57,45	28,1	34,5	175,6	182,3
	CH	CH ₂	CH ₂	COOH	COOH
	α	β	γ	α	γ
Cystin	57,45	39,0			
	CH	CH ₂			
	α	β			

der chemischen Verschiebung bei Änderung des pH-Wertes von pH 7 auf pH 2 wird die Zuordnung der einzelnen Signale gesichert. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in der Abb. 13 dargestellt.

173.5 (+ 1.0)

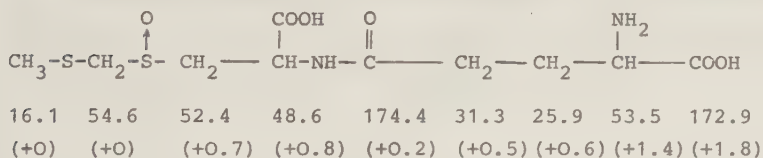


Abb. 13: ^{13}C -Spektrum: chemische Verschiebung (δ in ppm) von PMA in D_2O . Die Differenzen zwischen den Messungen in D_2O und saurem D_2O (pH = 2) in Klammern.

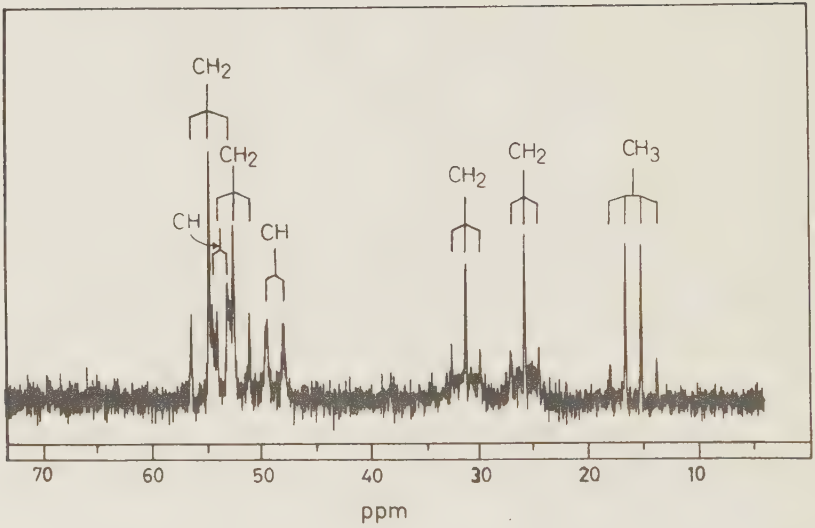


Abb. 14: ^{13}C -NMR-off-resonance-Spektrum von PMA.
132923 Impulse pro 2.047 sec.

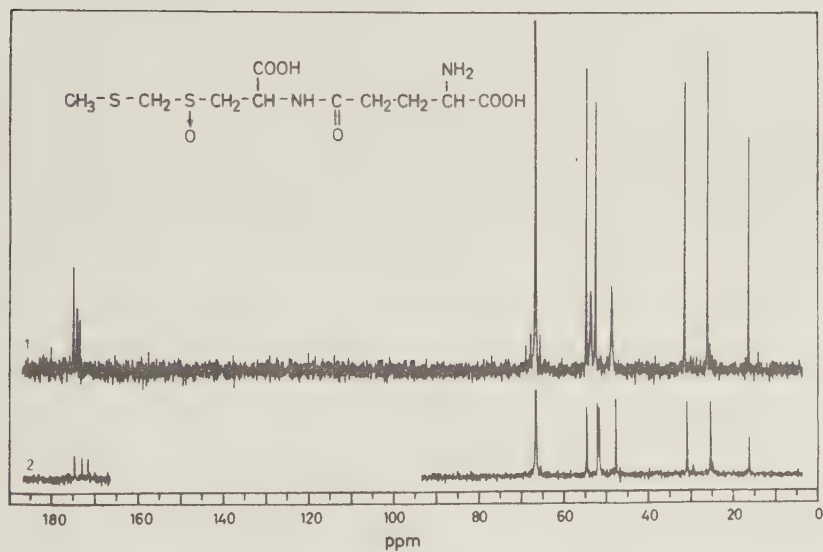


Abb. 15: ¹³C-NMR-Spektren von PMA in D₂O bei pH 7 (1) und bei pH 2 (2). Dioxan als interner Standard (67,0 ppm). 63 567 Impulse pro 1.023 sec.

4.7. Chemische Umsetzungen mit den Geruchsprecursors PMS und PMA

4.7.1. Saure Hydrolyse von PMS und PMA

PMS und PMA wurden einer milden Hydrolyse mit Hilfe eines Ionenaustauscherharzes (Dowex 50; H -Form) unterworfen. Dazu wurden etwa 2 mg Substanz in 1 ml Wasser gelöst, die Lösung in eine Ampulle gegeben, in der sich etwa 50 mg Harz befanden. Die Lösung wurde mit 2 ml Äthanol versetzt. Die zugeschmolzenen Ampullen wurden 6 Stunden bei 100°C im Trockenschrank erhitzt. Anschließend wurde das Harz mit 3 ml 5 proz. Ammoniaklösung eluiert. Das Eluat wurde dünnschichtchromatographisch untersucht.

Das Ergebnis zeigt die Abb. 16.

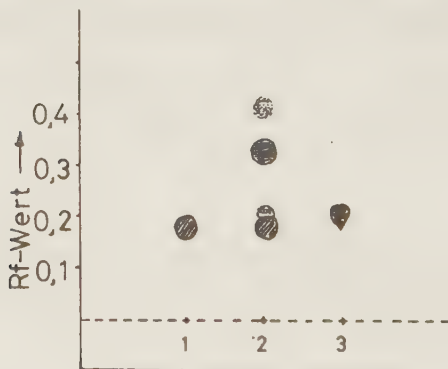


Abb. 16 : Wiedergabe des Chromatogramms der sauren Hydrolyse:
1 Glutaminsäure, 2 Precursor nach der Spaltung,
3 Cystein
Fließmittel: n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1)
Sprühmittel: Ninhydrin und K_2PtJ_6 -Reagenz

Deutlich erkennbar ist die L-Glutaminsäure bei Rf 0,18. Der Fleck mit dem größeren Rf-Wert, 0,32, (pos. Reaktion mit K_2PtJ_6 -Reagenz) ist vermutlich mit abgespaltenem Marasmin identisch. Die übrigen sehr schwachen Flecke, die ebenfalls positive Reaktionen mit K_2PtJ_6 -Reagenz ergaben, konnten vorläufig nicht geklärt werden.

4.7.2. Raney-Nickel-Spaltung von PMS und PMA

Da die absolute Konfiguration der Precursors PMS und PMA durch die Spektren nicht ablesbar war, wurden diese in bekannte Bezugssubstanzen, in diesem Falle in γ -Glutamyl-Alanin überführt. Mit Hilfe der optischen Drehung läßt sich daraus die Zugehörigkeit zur D- oder L-Reihe ableiten.

Zur Überführung der Precursors PMA und PMS in γ -Glutamyl-Alanin erschien die Raney-Nickel-Spaltung⁴⁸ als Methode der Wahl. Bei dieser reduktiven Spaltung werden nur die C-S-Bindungen gespalten, nicht aber die Peptidbindung, so daß tatsächlich γ -Glutamyl-Alanin zu erwarten war. Hierzu wurden die Precursors in wässriger Suspension zwei Stunden mit aktivem Raney-Nickel bei Raumtemperatur gerührt. Das hierbei gewonnene Spaltprodukt wurde nach Extraktion mit Wasser über einen Ionenaustauscher (Dowex 50; H-Form) in üblicher Weise gereinigt. Durch Umkristallisieren aus Äthanol/Wasser wurden 10 mg γ -Glutamyl-Alanin gewonnen.

Die optische Drehung betrug $[\alpha]_D^{20} = 7,0^\circ$ ($c = 0,1$; 1n NaOH).

Der in der Literatur angegebene Wert beträgt für γ -L-Glutamyl-L-Alanin $[\alpha]_D^{20} = 7,3^\circ$ ($c = 0,1$; 1n NaOH)^{96,97}. Da die Werte der Raney-Nickel Spaltprodukte mit dem für γ -L-Glutamyl-L-Alanin übereinstimmen, müssen beide Aminosäuren, die in den Precursors als Bausteine enthalten sind, nämlich Cystein und Glutaminsäure, der L-Reihe angehören.

4.7.3. Spektroskopische Methoden zur Identifizierung der Spaltprodukte aus den Raney-Nickel-Spaltungen

4.7.3.1. IR-Absorptionsspektroskopie

Aus Abb. 17 ist ersichtlich, daß die Kurven der beiden Infrarotspektren von authentischem γ -L-Glutamyl-L-Alanin und dem Spaltprodukt der Raney-Nickel-Spaltung im Bereich von $4000-650\text{ cm}^{-1}$ völlig übereinstimmen.

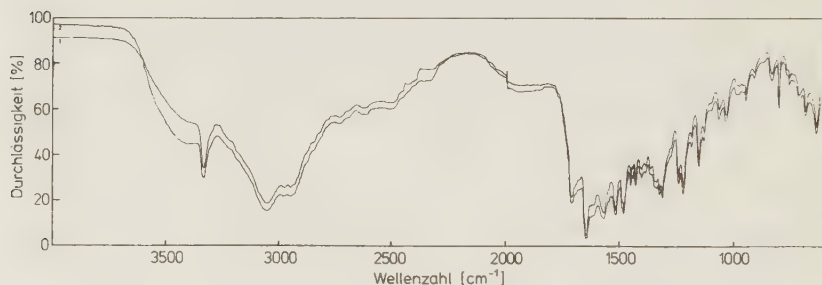


Abb. 17: Überlagerungsspektrum von authentischem γ -L-Glutamyl-L-Alanin (1) und Spaltprodukt von PMA (2)

4.7.3.2. ¹H-NMR-Spektroskopie

Die ¹H-NMR-Spektren von γ -L-Glutamyl-L-Alanin (authentisch) und der Raney-Nickel-Spaltprodukte der Geruchsprecursors PMA und PMS zeigten ebenfalls völlige Übereinstimmung in neutraler, alkalischer und saurer Lösung.

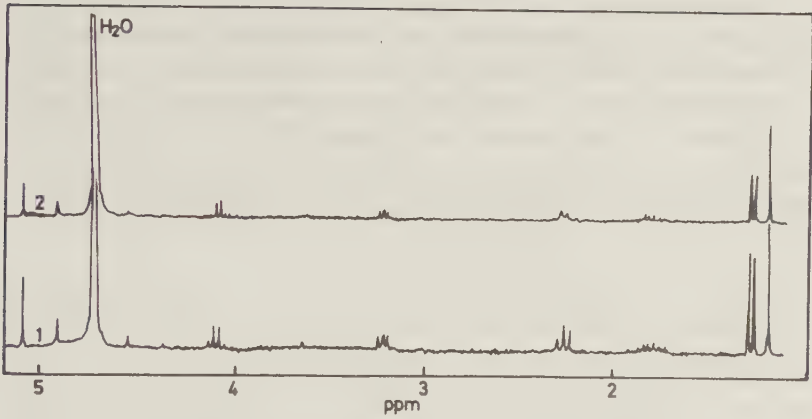


Abb. 18: 270-MHz ^1H -NMR-Spektrum von γ -L-Glutamyl-L-Alanin in D_2O bei pH 2 (1) und pH 7 (2). (t-BuOH als interner Standard $\sigma = 1,22$ ppm)

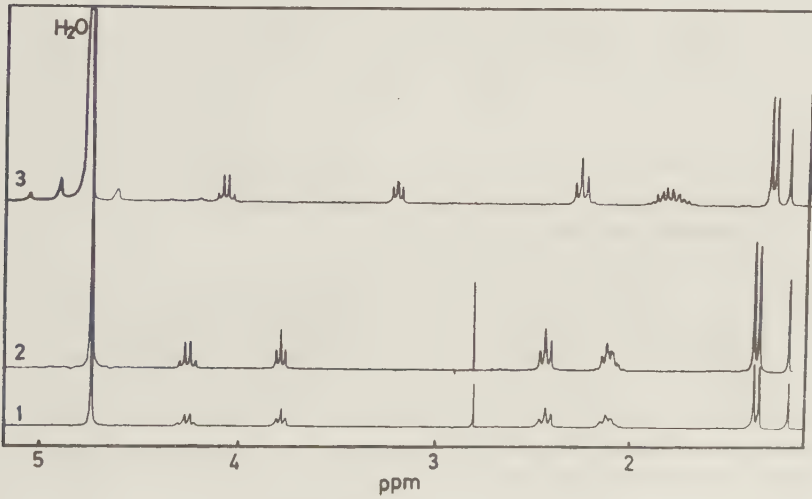


Abb. 19: 270-MHz ^1H -NMR-Spektren der Spaltprodukte von PMA und PMS in D_2O bei pH 3 (1;2), außerdem PMA bei pH 9 (3). (t-BuOH als interner Standard $\sigma = 1,22$ ppm).

In neutraler Lösung (pH 7) liegt der A₃-Teil des für Alanin zu erwartenden A₃X-Spektrums bei $\sigma = 1,30$ ppm, der entsprechende X-Teil bei $\sigma = 4,08$ ppm. Die Signale bei $\sigma = 1,85$ ppm, $\sigma = 2,30$ ppm sowie $\sigma = 3,21$ ppm entsprechen denen in den Geruchsprecursors und zeigen die Signale für die Glutaminsäure. Die Signale um $\sigma = 5$ ppm sind wahrscheinlich wieder nicht entkoppelte NH- oder OH-Protonen und sind für die Interpretation ohne Bedeutung.

4.8. Strukturvorschlag für PMS und PMA

Da bei der Raney-Nickel-Spaltung keine Inversion eintritt, muß aufgrund aller bisher bekannter Daten der Geruchsprecursors PMA und PMS geschlossen werden, daß es sich bei beiden Verbindungen um γ -L-Glutamyl-3-(Methylthiomethylsulfinyl)-L-Alanin handelt.

Abb. 20 zeigt die Strukturformel dieser Verbindung, die der Einfachheit halber γ -Glutamyl-Marasmin heißen soll.

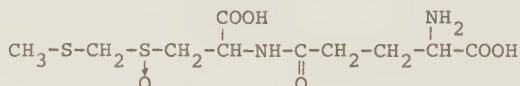


Abb. 20: γ -Glutamyl-Marasmin

4.9. Vorläufige Charakterisierung der Enzyme der drei Marasmius-Arten

Die noch verbliebene Menge des Drogenmaterials (es standen jetzt nur noch 15 g getrockneter *Marasmius scorodonius* QUEL., 5 g *Marasmius alliaceus* JACQ. und einige Fruchtkörper von *Marasmius prasioides* FR. zur Verfügung) erlaubte allein schon mengenmäßig keine umfassende Charakterisierung der Enzyme. Außerdem standen uns hierfür die erforderlichen Apparaturen leider nicht zur Verfügung.

Schon aus den oben aufgeführten PC- und DC-Vorversuchen war ersichtlich, daß in allen drei *Marasmius*-Arten der Geruchs-

precursor in zwei enzymatischen Schritten gespalten wird. Außerdem ließen sich bereits einige Eigenschaften der beiden beteiligten Enzyme, nämlich der γ -Glutamyltranspeptidase und der C-S-Lyase ableiten, die im folgenden beschrieben werden.

4.9.1. Charakterisierung und Aktivitätsbestimmung der γ -Glutamyltranspeptidase in *Marasmius scorodonius* QUEL. und *Marasmius alliaceus* JACQ.

Die chromatographischen Voruntersuchungen hatten gezeigt, daß Glutathion und γ -Glutamyl-4-Nitroanilid geeignete Substrate für die in den Pilzen enthaltenen γ -Glutamyltranspeptidasen sind. Es konnte in Übereinstimmung mit Literaturangaben⁷³ außerdem festgestellt werden, daß die Transpeptidasen in Gegenwart geeigneter Akzeptoren erhöhte Aktivität besitzen. Bei der enzymatischen Spaltung von γ -Glutamyl-4-Nitroanilid entsteht 4-Nitroanilin, das spektralphotometrisch bei 405 oder 410 nm⁷¹ bestimmt werden kann. Nachfolgende Bestimmung basiert auf diesem Prinzip.

Zu 1 ml einer gelfiltrierten Rohenzymlösung wurden 9 ml 0,25 M Tris-Citrat-Puffer pH 8,5 und 50 μ Mol γ -Glutamyl-4-Nitroanilid zugegeben. Ein zweiter Ansatz enthielt zusätzlich 500 μ Mol L-Methionin. Sämtlichen Prüflösungen wurden in gewissen Zeitabständen Proben entnommen und die Spaltungsraten spektralphotometrisch bestimmt. Abb. 21 zeigt die Substratumsätze bei *Marasmius scorodonius* QUEL. Abb. 22 bei *Marasmius alliaceus* JACQ., mit und ohne Zusatz von Methionin. Aus diesen Abbildungen ist ersichtlich, daß die Transpeptidase in *Marasmius alliaceus* JACQ. etwas weniger aktiv als in *Marasmius scorodonius* QUEL. ist. Außerdem ist in beiden Fällen gut erkennbar, daß Methionin als Akzeptor den Substratumsatz beschleunigt.

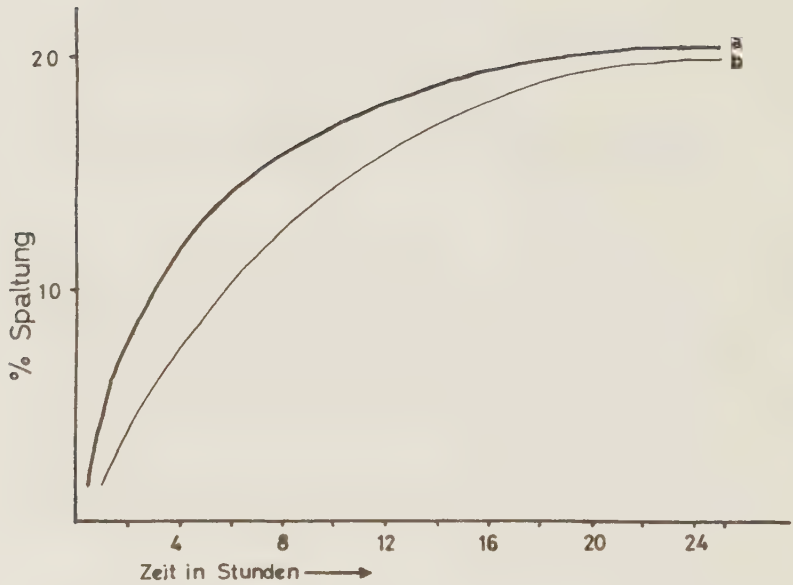


Abb. 21: Zeitlicher Verlauf des Substratumsatzes
(γ -Glutamyl-4-Nitroanilid 50 μ Mol) a) mit Methio-
nin (500 μ Mol), b) ohne Methionin bei *Marasmius*
scorodonius QUEL.

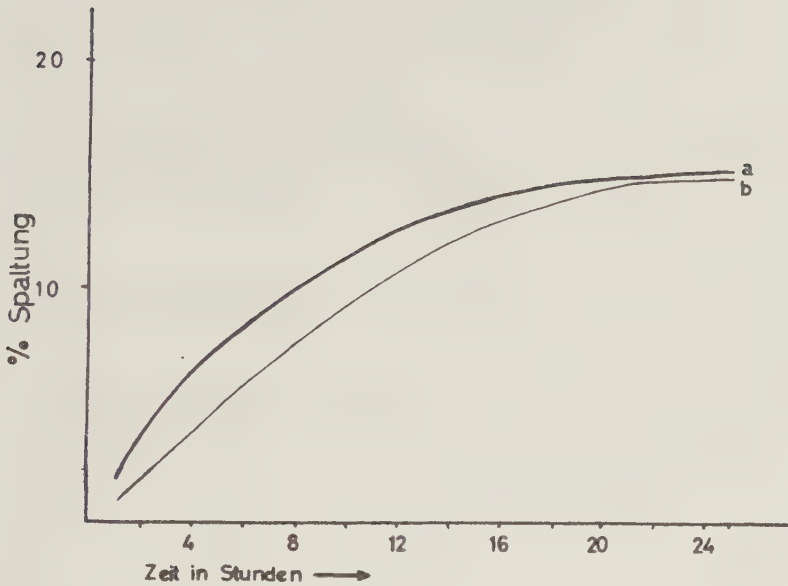


Abb. 22: Zeitlicher Verlauf des Substratumsatzes
(γ -Glutamyl-4-Nitroanilid 50 μ Mol) a) mit
Methionin (500 μ Mol), b) ohne Methionin bei
Marasmius alliaceus JACQ.

4.9.2. Aktivitätsbestimmungen der C-S-Lyasen in *Marasmius scorodonius* QUEL., *Marasmius alliaceus* JACQ. und *Marasmius prasiosmus* FR.

4.9.2.1. Abhängigkeit der Enzymaktivität vom pH-Wert

0,2 ml gelfiltrierte geruchlose Rohenzymlösungen wurden in Phosphat- und Tris-Pufferlösungen¹² mit unterschiedlichen pH-Werten auf ihre Aktivität gegenüber S-Äthyl-L-Cystein und S-Äthyl-L-Cysteinsulfoxid geprüft. Die Inkubationszeit betrug zwei Stunden.

Freigesetztes Ammoniak wurde nach einer modifizierten Conway-Mikrodiffusionsmethode mit Hilfe von Neßlers-Reagenz photometrisch bestimmt^{40a}.

Bei *Marasmius scorodonius* QUEL. und *Marasmius alliaceus* JACQ. zeigte die Pilz C-S-Lyase ihr Optimum im schwach alkalischen Bereich (pH 7,2-8).

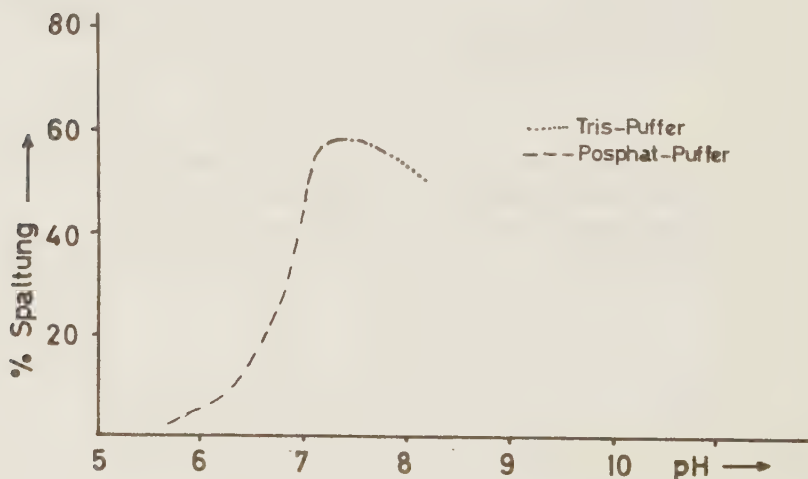


Abb. 23: Abhängigkeit der Enzymaktivität (*Marasmius scorodonius* QUEL.) vom pH-Wert.

Einzelansätze: 0,2 ml gelfiltrierte Enzymlösung und 8,7 mg Substrat auf 10 ml Pufferlösung (Phosphat-, Tris-Puffer).

4.9.2.2. Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Temperatur

0,2 ml gelfiltrierte geruchslose Rohenzymlösung wurde bei einem pH-Wert von 7,5 bei unterschiedlichen Temperaturen auf ihre Aktivität gegenüber S-Äthyl-L-Cystein geprüft. Die Inkubationszeit betrug 5 Stunden, bestimmt wurde wieder die durch die enzymatische Spaltung gebildete Ammoniakmenge. Die Enzyme besitzen ihr Wirkungsoptimum zwischen 25-35°C. Unter 10°C und über 50°C findet keine meßbare Spaltung statt.

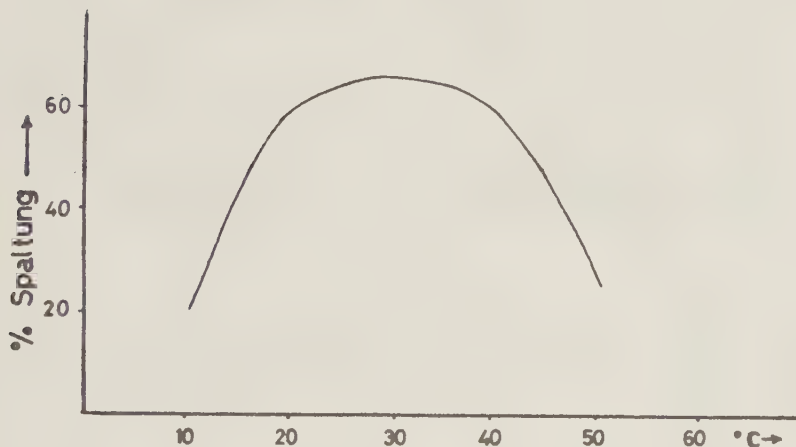


Abb. 24: Abhängigkeit der Aktivität des Pilzenzyms (*Marasmius scorodonius* QUEL.) von der Temperatur. Einzelansätze mit 0,2 ml gelfiltrierter Rohenzymlösung, 8,7 mg Substrat auf 10 ml Phosphatpufferlösung pH 7,5.

4.9.2.3. Substratspezifität der Pilzenzyme

Zur vorläufigen Charakterisierung der Substratspezifität der Pilz C-S-Lyasen wurden folgende synthetische Substrate eingesetzt: S-Methyl-, S-Äthyl-, S-Propyl-, S-Allyl-, S-Benzyl-L-Cystein und L-Djenkolsäure.

0,2 ml geruchlose gelfiltrierte Rohenzymlösung wurde in Phosphatpuffer pH 7,5¹² bei 30°C mit je 1 µMol Substrat inkubiert. Aus der Abb. 25 ist der zeitliche Verlauf der Spaltung ersichtlich.

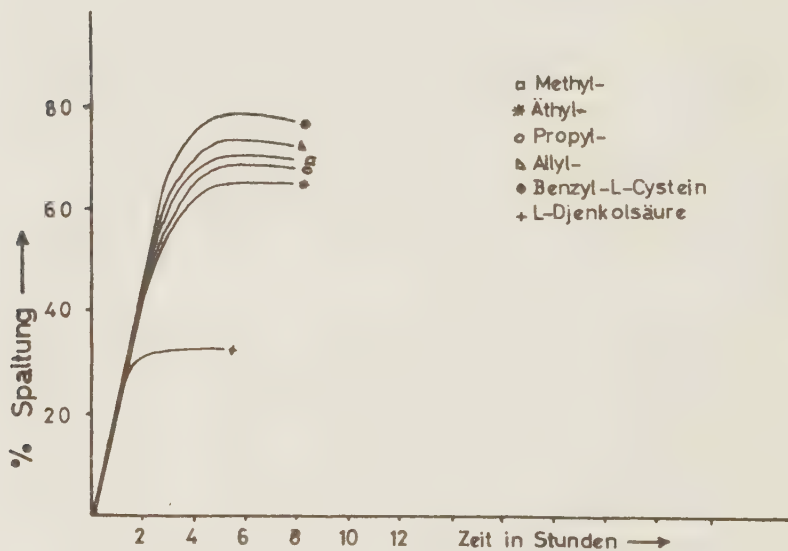


Abb. 25: Zeitlicher Verlauf der enzymatischen Spaltung von einigen Cysteinderivaten (1 µMol) in 10 ml Phosphatpufferlösung pH 7,5

Unter den gleichen Bedingungen wurden weiterhin folgende synthetische S-Alkyl-L-Cysteinsulfoxidderivate als Substrate geprüft: S-Methyl-, S-Äthyl-, S-Propyl-, S-Allyl-, S-Benzyl-L-Cysteinsulfoxid.

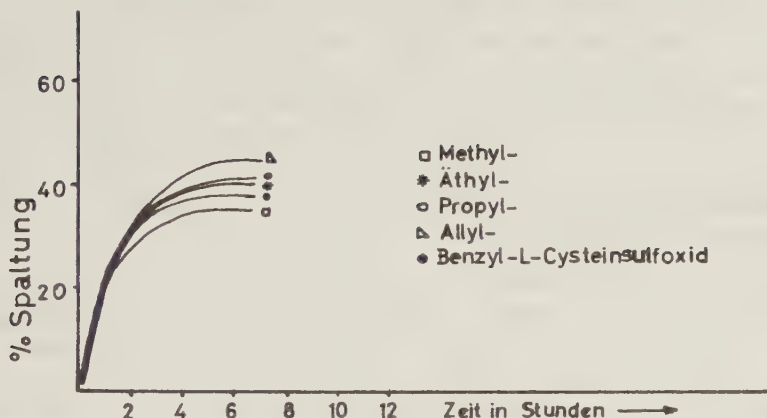


Abb. 26: Zeitlicher Verlauf der enzymatischen Spaltung von einigen Cysteinsulfoxidderivaten (1 μ Mol) in 10 ml Phosphatpufferlösung pH 7,5

4.9.2.4. Nachweis von C-S-Lyase-Isoenzymen in den gel-filtrierten Pilzenzymlösungen

Viele Enzyme können in multiplen molekularen Formen auftreten, wie man seit der Entdeckung verschiedener, durch Elektrophorese trennbarer Lactatdehydrogenase-Fraktionen erkannt hat²⁴.

Solche multiplen Formen von Enzymen nennt man heute Isoenzyme.

Obwohl inzwischen mehrfach versucht wurde, C-S-Lyasen aus *Allium*-Arten, besonders aber C-S-Lyasen vom Typ der Albizzia-C-S-Lyase, anzureichern und zu reinigen, war bisher nicht erkannt worden, daß auch die C-S-Lyasen komplex zusammengesetzte Aggregate von Isoenzymen darstellen, deren einzelne Iso-

enzyme wahrscheinlich unterschiedliche Substratspezifitäten aufweisen, wie die im folgenden gebrachten Beispiele zeigen werden. Für die Auftrennung bestimmter Enzyme, z. B. Lactatdehydrogenase, in Isoenzyme konnte bereits die einfachste Art der Elektrophorese, nämlich die Papierelektrophorese oder die Cellogel-Elektrophorese erfolgreich eingesetzt werden. Da aber Enzyme aus höheren Pflanzen oder Pilzen sich erfahrungsgemäß schlecht mit diesen beiden Methoden trennen lassen, wurde versucht, verschiedene C-S-Lyasen unterschiedlicher Herkunft (Pilze, Allium-Arten, *Albizzia lophantha*, *Paederia foetida*) durch Polyacrylamidgel-Elektrophorese^{8,98} zunächst von Begleitenzymen abzutrennen und dann auch in einzelne Untereinheiten, d. h. in Isoenzyme, aufzutrennen.

Da für die Sichtbarmachungen von C-S-Lyasen keine geeigneten Substrate bekannt waren, deren Spaltprodukte sich z. B. wie bei Esterasen durch Kopplung mit Diazoniomverbindungen erfassen lassen oder in sonstigen Reaktionen zu sichtbaren, möglichst gefärbten Produkten führen, oder wie bei Indoxyl-haltigen Substraten zu gefärbten Ablagerungen führen bzw. wie bei 4-Nitrophenyl- oder 4-Nitroanilin-Substraten gefärbte Spaltprodukte geben, wurde zunächst versucht, einige chromogene Derivate von L-Cystein zu synthetisieren.

Als einfachstes chromogenes Substrat bot sich S-(4-Nitrophenyl)-L-Cystein an, das als solches nur schwach gelblich gefärbt ist, während 4-Nitrophenylmercaptan kräftig orangefarben ist.

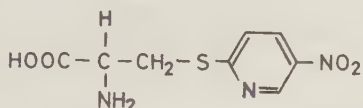
S-(4-Nitrophenyl)-L-Cystein wurde nach Literaturangaben⁴⁸ durch eine Sandmayer-Reaktion aus diazotiertem 4-Nitroanilin und L-Cystein in Gegenwart von Cupro-Salzen dargestellt. Es wird in vitro bei pH 8 von *Albizzia*-C-S-Lyase und verschiedenen rohen Pilz C-S-Lyasen tatsächlich unter Bildung von Brenztraubensäure, Ammoniak und stark gefärbtem 4-Nitrophenylthiol (orangerot) gespalten. Nachteilig bei diesem Substrat ist jedoch, wie HANSEN, KJAER und SCHWIMMER⁹⁵ schon bei 2.4-Dinitrophenyl-L-Cystein beobachtet haben, daß auch S-(4-Nitrophenyl)-L-Cystein im schwach alkalischen Bereich des pH-Optimums der C-S-Lyase bereits eine merkliche Umlagerung er-

führt, wobei der 4-Nitrophenylrest von der S- zur NH₂-Gruppe wandert (Acylwanderung), unter Bildung von gelbem N-4-Nitrophenyl-L-Cystein⁹⁵.

Bei pH 8-9 färbten sich also auch enzymfreie Kontrollen nach einiger Zeit gelblich, so daß geringe C-S-Lyase-Aktivitäten nach dieser Methode unsicher nachweisbar oder meßbar sind. Immerhin gelang es mit diesem Substrat, bei *Albizzia lophantha*-Samen sowie bei Pilzpulvern von *Marasmius scorodoni* QUEL. und *Marasmius alliaceus* JACQ. noch deutlich die vorhandene C-S-Lyase nachzuweisen.

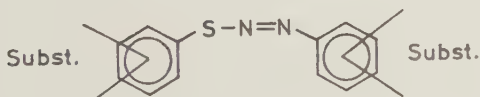
Durch Umsetzung von 2-Chlor-5-Nitropyridin mit L-Cystein wurde S-2-(5-Nitropyridyl)-L-Cystein als schwach gelblich gefärbte Substanz erhalten, die in der Literatur noch nicht beschrieben ist.

Formel:



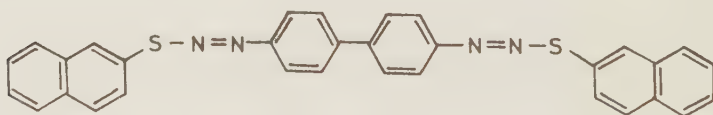
Einwirkung von *Albizzia* - sowie *Marasmius*-C-S-Lyase führt zur Bildung des intensiv gelb gefärbten 5-Nitro-2-thiolpyridins bzw. von 5-Nitro-1,2-Dihydro-2-Pyridin-2-thion. Aber auch dieses Substrat erleidet bei pH 8-9 Umlagerungen unter Acylwanderung zum gelben N-5-Nitropyridyl-L-Cystein, so daß es nur unter Berücksichtigung der Blindwerte für Messungen von Enzymaktivitäten verwendet werden kann.

Im Gegensatz zu Phenolen, die in p- oder in o-Stellung mit aromatischen Diazoverbindungen koppeln, bilden die analogen Thiole mit Diazoniumverbindungen Kopplungsprodukte der



Enzymsubstrate, die solche Thiole bilden, wurden unter Verwendung von Echtblausalz B als "Abfangverbindung" zum elektronenmikroskopischen histochemischen Nachweis von Esterasen verwendet, da sie osmiophil sind, d. h. Os O_4 reduzieren. Durch Anlagerung von 2-Naphtalinthiol an Acetamidoacrylsäure wurde N-Acetyl-S-2-Naphtyl-DL-Cystein dargestellt. Dieses wurde durch Einwirkung von Pilzpulvern geeigneter höherer Pilze, die nach unseren Untersuchungen reichlich Acylasen vom Typ der Nieren-Acylase I enthalten, z. B. *Agaricus bisporus*, zum S-2-(Naphtyl)-L-Cystein gespalten.

S-2-(Naphtyl)-L-Cystein wird tatsächlich bei pH 8-9 von Albizzia- und *Marasmius*-C-S-Lyase gespalten und sein Spaltprodukt, Naphtalinthiol, gibt mit Echtblausalz B einen unlöslichen, stark gelben Farbstoff, der vermutlichen Formel:



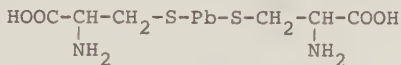
Da aber einerseits S-2-(Naphtyl)-L-Cystein bei pH 8-9 nur sehr wenig löslich ist, andererseits aber C-S-Lyasen offensichtlich in Gegenwart der "Abfängersubstanz" Echtblausalz B beträchtlich inhibiert werden, konnte dieses an sich erfolgversprechende Substrat bislang nicht mit genügend sicherer Handhabung für den C-S-Lyasen Nachweis in Elektropherogrammen eingesetzt werden.

Vielleicht könnte dies durch Einführung geeigneter Substituenten in das Ringsystem des Naphtalins gelingen.

Das einfachste C-S-Lyase-Universalsubstrat wurde schließlich in L-Cystein gefunden. Wie in Versuchen mit Endospermpulver von *Albizzia lophantha*, Pilzpulvern von *Marasmius alliaceus* JACQ., *Marasmius prasiosmus* FR., *Marasmius scorodonius* QUEL. und *Lentinus edodes*, sowie Pulver getrockneter Pflanzen von *Paederia foetida* und spätere Disc-Polyacrylamid-Elektrophoresen mit Auszügen dieser Arten ergaben, wird L-Cystein bei

pH 8-9 durch C-S-Lyasen und ihre einzelnen Isoenzyme unter H_2S -Bildung gespalten.

Als "Abfänger-Ionen" konnten Blei-Ionen zugesetzt werden, da die C-S-Lyasen, im Gegensatz zu vielen anderen Enzymen, offensichtlich völlig unempfindlich gegen Bleisalze sind. Da Bleisalze in höherer Konzentration mit L-Cystein ein schwerlösliches Bleisalz der Formel:



bilden, muß die Substrat- und "Abfänger"-Konzentration richtig gewählt werden, wobei natürlich auch Phosphatpuffer (schwerlösliches Bleiphosphat!) durch ein anderes Puffersystem, z. B. Citratpuffer ersetzt werden muß.

Man beobachtet mit diesem Nachweisreagenz rasch einsetzende und sich zunehmend verstärkende schwarzbraune Kolloidbildung. Im Polyacrylamidgel bilden sich bei der Inkubation schon nach kurzer Zeit deutliche, braune Banden von PbS. Zugabe von Pyridoxalphosphat beschleunigt auch bei Enzymen aus Pilzen die Spaltungsrate sehr stark und beweist somit, daß PALP auch bei den C-S-Lyasen von *Marasmius*-Arten die Rolle eines Coenzym spielt, wie es schon für die bisher bekannten C-S-Lyasen nachgewiesen worden war^{16,65,66}.

Als aktivste C-S-Lyase mit 6 Isoenzymbanden erwies sich der Enzymkomplex aus *Albizzia lophantha*. Die Bildung der schwarz-braunen Banden setzte schon nach einigen Minuten ein und nach 60-90 Minuten Inkubationsdauer war sie optimal. Wie schon in Vorversuchen beobachtet worden war, war die C-S-Lyase aus *Marasmius scorodoni* QUEL. unter den Pilzenzymen die aktivste. Hier mußten die PAA-Gele etwa drei Stunden lang inkubiert werden, um optimale Abzeichnung der Isoenzymbanden zu erzielen. *Marasmius prasiosmus* FR. verhielt sich ähnlich wie *Marasmius scorodoni* QUEL. Die Enzymkomplexe aus *Marasmius alliaceus* JACQ., *Lentinus edodes* und vor allem aus *Paederia foetida* benötigten erheblich längere Inkubationszeiten (ca. 6 Stunden), um alle Isoenzymbanden deutlich erkennen zu lassen. Die Abb. 27 zeigt, daß die C-S-Lyasen mit ihren Isoenzymen in

allen untersuchten Arten verschiedene Aufspaltungsmuster zeigten.

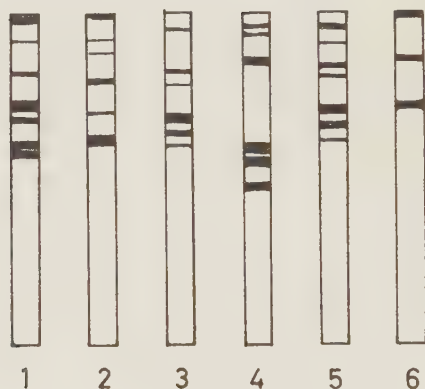


Abb. 27: Disc-Elektrophorese der C-S-Lyase Isoenzyme auf 7,5 proz. Polyacrylamidgelen.

- 1) *Marasmius scorodonius* QUEL.,
- 2) *Marasmius alliaceus* JACQ.,
- 3) *Marasmius prasiosmus* FR., 4) *Lentinus edodes*,
- 5) *Albizzia lophantha*, 6) *Paederia foetida*

Bei einigen Untersuchungen wurden Fertiggele der Firma Bio-Rad-Laboratories verwendet. Diese Fertiggele waren aber umständlicher zu handhaben, und für die Elektrophorese wurden vier Stunden benötigt. Da sie außerdem keine schärfere Zonentrennung ergaben, wurden in allen weiteren Untersuchungen selbsthergestellte PAA-Gele verwendet.

V. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

EXPERIMENTELLER TEIL

5.1. Allgemeine Angaben

1. Drogenherkunft

Marasmius alliaceus JACQ. wurde im Herbst 1975 in der Gegend von Bonn (Bröltal/Hennef) von Herrn Professor Dr. W. Steglich gesammelt: 75 g getrocknete Fruchtkörper.

Marasmius scorodonius QUEL. wurde im September 1975 von Herrn Professor Dr. R. Gmelin in der Umgebung von Welschnofen und Deutschnofen (Dolomiten, Italien) gesammelt: 120 g getrocknete Fruchtkörper.

Marasmius scorodonius QUEL. wurde von Juni bis Oktober 1975 von Herrn Professor Dr. R. Gmelin, T. Luxa und H.-H. Luxa im West-Berliner Gebiet gefunden und sofort unter Umluft bei 30°C getrocknet: 100 g Trockenmaterial.

Marasmius prasiosmus FR. wurde von Herrn E. Gerhardt im Oktober 1975 in Berlin gefunden: 1 g getrocknetes Material. Die Pilze wurden von den Herren H. Michaelis und E. Gerhardt (Berlin) bestimmt.

2. Chromatographie

Zur Dünnschichtchromatographie wurden DC-Fertigplatten Kieselgel F₂₅₄ Merck und Cellulose Merck von 20 x 20 cm Größe verwendet. Zur Papierchromatographie fand das Papier Macherey und Nagel Nr. 214 Verwendung. Es wurde aufsteigend entwickelt. Konzentrations- und Verhältnisanangaben bei Laufmitteln beziehen sich auf Volumina (Vol.+Vol.). Nur bei dem Fließmittel Phenol/Wasser bezieht sich die Angabe des Mischungsverhältnisses auf Gewicht und Volumen (g+Vol.).

3. Schmelzpunktbestimmungen

Die Schmelzpunkte wurden mit dem Kofler-Heiztischmikroskop bestimmt, sie sind nicht korrigiert.

4. Mikroanalysen

Die Mikroanalysen wurden im Mikroanalytischen Labor I. Beetz, 8640 Kronach, am Pharmazeutischen Institut Berlin, am Organisch-Chemischen Institut der Freien Universität Berlin und am Organisch-Chemischen Institut der Technischen Universität Berlin durchgeführt.

5. IR-Spektroskopie

Die IR-Spektren wurden mit einem Leitz-Unicam-Spektralphotometer SP 200 G in KBr-Preßlingen aufgenommen (Konzentration: 1,2 mg/150 mg).

6. ^1H -NMR-Spektroskopie

Die Kernresonanzspektren wurden mit dem Spektrometer Brucker WH 270 aufgenommen.

7. ^{13}C -NMR-Spektroskopie

Die ^{13}C -Spektren wurden mit dem Spektrometer Varian CFT-20 aufgenommen. Dioxan diente als interner Standard.

8. Feld-Desorptions-Massenspektroskopie

Die Feld-Desorptions-Massenspektren wurden mit dem Massenspektrometer Varian MAT 311 A durchgeführt.

9. Optische Drehung

Die Messung der optischen Drehung erfolgte mit dem Lichtelektrischen Präzisions-Polarimeter LEP A2 Zeiss 0,005°.

10. Elektrophorese

Die Elektrophorese wurde mit DC-Platten Cellulose Macherey Nagel und DC-Kieselgelplatten F₂₅₄ mit dem Gerät CAMAG TL bei 600 V 30 mA durchgeführt. Zur Disc-Elektrophorese stand ein Gerät, das zwölf Gelröhrchen faßte, zur Verfügung.

11. UV-Spektroskopie

Die Absorptionsspektren wurden mit einem Zeiss-Spektralphotometer DMR 21 aufgenommen (Quarzküvette 1 cm Schichtdicke).

Als Lösungsmittel wurde Methanol verwendet.

5.2. Extraktion der Droge

30 g getrocknete Fruchtkörper von *Marasmius alliaceus* JACQ. wurden wie folgt verarbeitet: Der getrocknete Pilz wurde fein gemahlen und das Pulver in 100 ml siedendes Methanol eingetragen. Nach Dekantieren wurde der Pilzrückstand mit 500 ml Wasser fünf Minuten lang aufgeköcht. Die filtrierten Auszüge wurden eingengt: Extrakt 1 B.

5.3. Isolierung des Geruchsprecursors PMA

5.3.1. Anreicherung der gesamten Aminosäuren und Peptide

Der Extrakt 1 B wurde in 300 ml Wasser aufgenommen. Die Extraktlösung wurde durch eine Säule mit Amberlite IR 120 in H-Form (300 ml) geschickt. Der Durchlauf war laut PC-Kontrolle frei von Aminosäuren und Peptiden. Er enthielt Anionen und Neutralstoffe und wurde verworfen. Anschließend wurde mit 500 ml Wasser nachgewaschen. Die ausgetauschten Aminosäuren und Peptide wurden in üblicher Weise mit 5 proz. Ammoniaklösung vom Harz abgelöst. Fraktionen à 100 ml wurden auffangen. Die Aminosäuren und Peptiden enthaltenden Fraktionen wurden durch Tüpfeln auf PC-Papier und Ninhydrin- bzw. K_2PtJ_6 -Reaktionen ermittelt; sie wurden im Rotationsverdampfer schonend eingedampft: Rückstand 5.3.1.

5.3.2. Abtrennung der sauren Aminosäuren und Peptide

Der Rückstand 5.3.1. wurde in 300 ml Wasser gelöst. Die Lösung wurde durch eine mit 100 ml Lewatit MP 5080 (Acetatform) gefüllte Säule geschickt.

Der Durchlauf enthielt laut Dünnschichtelektrophorese aus-

schließlich neutrale und basische Aminosäuren. Nach Waschen der Harzsäule mit 200 ml Wasser wurden die ausgetauschten sauren Aminosäuren und Peptide durch Elution mit 5 proz. Essigsäure vom Harz abgelöst. Kontrolle des Elutionsprozesses erfolgte wie oben durch Tüpfelreaktionen auf PC-Papier mit Ninhydrin- und K_2PtJ_6 -Reagenz.

Die entsprechenden Eluatfraktionen wurden im Vakuum eingedampft: Rückstand 5.3.2. (saure AS- und Peptidfraktion).

5.3.3. Feintrennung der sauren Aminosäure- und Peptidfraktion von 5.3.2.

Der Rückstand 5.3.2. wurde in 5 ml Wasser gelöst, auf eine Säule mit 20 g gequollenem Sephadex A 25 DEAE (Acetatform) gebracht. Nach Nachdrücken mit 10 ml Wasser wurde stufenweise mit (zwischen 1 proz. und 5 proz.) steigenden Essigsäurekonzentrationen eluiert. Fraktionen à 5 ml wurden aufgefangen und einzeln durch DC geprüft: 20 μ l der Eluatfraktionen wurden aufgetragen. Nach Entwickeln in BEW (4:1:1) wurde mit Ninhydrin und K_2PtJ_6 -Lösung besprüht. Der gesuchte Precursor befand sich in den Fraktionen 30 bis 42. Diese Fraktionen wurden vorsichtig eingedampft. Der Rückstand wurde in 30 ml Wasser heiß gelöst. Nach Zugabe, unter vorsichtigem Erwärmen, von 10 ml Äthanol, bis zur beginnenden Trübung, setzte Kristallisation ein. Nach 12 Stunden im Kühlschrank hatten sich längliche, farblose Kristalle gebildet. Ausbeute nach nochmaligem Umfällen aus Äthanol/Wasser 247 mg farblose Kristalle mit schwachem Knoblauchgeruch: Geruchsprecursor PMA.

5.4. Bereitung der Ionenaustauscher

5.4.1. Amberlite IR 120

Der Ionenaustauscher wurde wie folgt vorbereitet:

Ein Chromatographierohr ($\varnothing$ 4,5 cm, Länge 60 cm) mit Schliffhahn und G2-Glasfrittenboden wurde mit einer Aufschlemmung eines sauren Ionenaustauscharzes, 300 g Amberlite IR 120 in Wasser aufgeschlemmt, beschickt. Die Schichthöhe betrug nach

dem Absetzen 47 cm. Nun wurde der Ionenaustauscher in seine aktive Form (H -Form) gebracht. Dies wurde wie folgt erreicht: durch den Ionenaustauscher wurden 1000 ml 10 proz. Salzsäure gegeben, danach wurde mit 300 ml Wasser gewaschen.

5.4.2. Lewatit MP 5080

Der Ionenaustauscher wurde wie folgt vorbereitet:

Ein Chromatographierohr ($\varnothing$ 2 cm, Länge 40 cm) wurde mit einem Harz, 100 g Merck Lewatit MP 5080, das in Wasser aufgeschlemmt war, gefüllt. Die Schichthöhe betrug nach dem Absetzen 25 cm. Das Harz wurde mit 500 ml 10 proz. Natronlauge perkoliert und mit Wasser bis zur neutralen Reaktion gegen Universalindikatorpapier gewaschen. Um den Ionenaustauscher in die Acetatform zu bringen, wurde anschließend mit 500 ml 10 proz. Essigsäure perkoliert und danach bis zur neutralen Reaktion gegen Universalindikatorpapier mit Wasser gewaschen.

5.4.3. Sephadex A 25 DEAE

Die Säule wurde wie folgt bereitet:

Ein Chromatographierohr ($\varnothing$ 1,5 cm, Länge 40 cm) mit einem Aufsatz ($\varnothing$ 4,0 cm, Länge 10 cm) wurde mit einer wässrigen Aufschlemmung von 20 g Sephadex A 25 DEAE gefüllt. Die Schichthöhe betrug nach dem Absetzen 29 cm. Um die Säule in die Acetatform zu bringen, wurde sie mit 100 ml 10 proz. Essigsäure durchgespült und anschließend mit Wasser bis zur neutralen Reaktion gegen Universalindikatorpapier gewaschen.

5.5. Eigenschaften des Geruchsprecursors PMA

Schmelzpunkt: 174°C (Zers.)

Elementaranalyse: $C_{10}H_{18}O_6N_2S_2 \cdot 1/2 H_2O$

Berechnet für 326,4: C 35,80; H 5,70; N 8,35; S 19,13 %

Gef.: C 36,00; H 5,51; N 8,10; S 18,27 %

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = - 5,5^{\circ}$ (c = 0,1; H_2O)

<u>Rf-Werte DC, PC</u>	DC	PC
Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1)	0,04	0,08
Butanol/Eisessig/Wasser/Isopropanol (8:2:5:3)	0,06	0,12
Phenol/Wasser (75:25)	0,16	0,4

Elektrophorese

Folgende Tabelle zeigt das Verhalten des Geruchsprecursors PMA und einiger anderer Substanzen in der Elektrophorese. Benutzt wurden Kieselgel- und Celluloseplatten. Die Dauer der Elektrophorese betrug 30 Minuten bei 600 V und 30 mA.

Tabelle VI:

	Phosphat-Puffer pH 6,5	Pyridin-Essigsäure-Wasser-Puffer pH 4,9	
	Cellulose-Platten	Kieselgel-Platten	Cellulose-Platten
PMA und PMS	3,0 cm	5,2 cm	3,0 cm
Glutaminsäure	4,7 cm	6,5 cm	4,0 cm
Asparaginsäure	5,5 cm	7,5 cm	5,1 cm
S- β -Carboxyäthyl-L-Cystein	4,6 cm	5,2 cm	3,0 cm
Glutathion	3,0 cm	5,2 cm	3,0 cm
Pikrinsäure	3,8 cm	7,8 cm	3,5 cm
S- β -Carboxyisopropyl-L-Cystein	4,2 cm	-	3,1 cm
Dichrostachinsäure	3,7 cm	-	3,1 cm
Histidin	2,5 cm	-	1,0 cm
Arginin	1,8 cm	-	1,2 cm
Lysin	6,4 cm	-	6,4 cm
β -Alanin	2,8 cm	-	1,0 cm
γ -Aminobuttersäure	2,0 cm	-	1,9 cm

5.6. Spektroskopische Daten des Geruchsprecursors PMA

5.6.1. IR-Absorption (0,83 mg/130 mg KBr)

$\nu = (\text{cm}^{-1})$: 680 m, 695 m, 760 m, 810 m, 845 w, 860 m, 910 w, 950 w, 960 m, 1000 s, 1020 s, 1040 m, 1070 w, 1120 w, 1140 m, 1190 m, 1240 s, 1310 s, 1340 s, 1360 m, 1380 m, 1405 m, 1425 m, 1440 w, 1460 w, 1515 s, 1535 s, 1550 s, 1630 s, 1660 s, 1720 s, 2980 m, 3020 m, 3295 s, 3400 s

5.6.2. Feld-Desorptions-Massenspektroskopie

Der Basispeak: $m/e = 327 (M+1)^+$

5.6.3. ^1H -NMR-Spektroskopie (in D_2O , 270 MHz)

$\delta = 2,15$ ppm Multiplett 2H ($-\text{CH}-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-$), $\delta = 2,24$ ppm Singulett 3H ($\underline{\text{CH}_3}-\text{S}-$), $\delta = 2,50$ ppm Triplet 2H ($-\text{CO}-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-$), $\delta = 3,30$ ppm AB-Teil eines ABX-Systems 2H ($-\text{CH}-\underline{\text{CH}_2}-\text{SO}$), $\delta = 3,89$ ppm Triplet 1H ($\text{NH}_2-\underline{\text{CH}}-\text{CH}_2-$), $\delta = 4,10$ ppm und $\delta = 4,17$ ppm AB-System 2H ($-\text{SO}-\underline{\text{CH}_2}-\text{S}-$), $\delta = 4,79$ ppm X-Teil des ABX-Systems 1H ($-\text{NH}-\underline{\text{CH}}-\text{CH}_2-$).

5.6.4. ^{13}C -NMR-Spektroskopie: (in D_2O , Dioxan als interner Standard, chemische Verschiebung im Sauren in Klammern)

174,4 ppm (+ 0,2), 173,5 ppm (+ 1,0), 172,9 ppm (+ 1,8) = 3 CO-Gruppen
54,6 ppm ($\pm$ 0), 53,5 ppm (+ 1,4), 52,4 ppm (+ 0,7), 48,6 ppm (+ 0,8), 31,3 ppm (+ 0,5), 25,9 ppm (+ 0,6), 16,1 ppm ($\pm$ 0) = 7 Kohlenstoffatome, die mit Protonen substituiert sind.

5.7. Chemische Umsetzungen mit dem Geruchsprecursor PMA

5.7.1. Saure Hydrolyse von PMA

Die Lösung des Geruchsprecursors (2 mg/1 ml H_2O) wurde mit 50 mg Ionenaustauscherharz (Dowex 50 H -Form) in eine Ampulle

gefüllt. Nach Zugabe von 2 ml Äthanol wurde die Ampulle zugeschmolzen. Sie wurde 6 Stunden bei 100°C im Trockenschrank erhitzt und anschließend nach Erkalten geöffnet. Der Überstand wurde verworfen. Das abfiltrierte Ionenaustauscherharz wurde mit 5 proz. Ammoniaklösung behandelt und die abgespaltenen Aminosäuren hierbei eluiert. Das konzentrierte Eluat wurde durch DC in mehreren Fließmitteln untersucht, wobei authentische L-Glutaminsäure als Kontrolle mitlief. Das bei der Hydrolyse entstandene Spaltprodukt erwies sich laut Rf-Werten und Ninhydrinfärbung in verschiedenen Systemen als identisch mit L-Glutaminsäure, was zusätzlich noch durch DC-Elektrophorese bestätigt werden konnte.

System A: n-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1

System B: n-Butanol/Eisessig/Wasser/Isopropanol 8:2:5:3

System C: Phenol/Wasser 75:25

	A DC	B DC	C DC
Rf-Wert der nach Hydrolyse eluierten Aminosäure:	0,18	0,13	0,08
Rf-Wert authent. Glutaminsäure	0,18	0,13	0,08

5.7.2. Raney-Nickel-Spaltung von PMA

25 mg PMA wurden in 10 ml Wasser gelöst und mit 1 g frisch aktiviertem Raney-Nickel versetzt:

10 g gepulverte Raney-Nickel-Legierung wurden in 100 ml Wasser aufgeschlemmt. 16 g festes Natriumhydroxid wurden schnell dazugegeben und unter Rühren in Lösung gebracht. Nach Einsetzen der heftigen Reaktion wurde noch so lange Natriumhydroxid hinzugefügt, bis keine Wasserstoffentwicklung mehr wahrzunehmen war. Danach wurde das aktivierte Raney-Nickel-Pulver so lange mit dest. Wasser gewaschen, bis das überstehende Waschwasser gegen Indikatorpapier neutral reagierte.

Nach 2 Stunden Rühren bei Zimmertemperatur wurde vom Rückstand abfiltriert. Der Rückstand wurde mit je 5 ml Wasser

extrahiert bzw. ausgewaschen. Filtrat und Waschwasser wurden durch eine Säule mit Dowex 50 H -Form (50 ml) geschickt. Nach Waschen des Harzes mit Wasser wurde das ausgetauschte Peptid mit 5 proz. Ammoniaklösung quantitativ abgelöst. Das Eluat wurde im Rotationsverdampfer schonend eingedampft.

Der Rückstand wurde in 3 ml heißem Wasser gelöst und die Lösung mit Äthanol bis zur Trübung versetzt und 12 Stunden im Kühlschrank aufbewahrt. Die gebildeten Kristalle wurden nochmals aus Wasser/Äthanol umkristallisiert. Ausbeute: 10 mg farblose Kristalle.

5.7.2.1. Eigenschaften des Spaltprodukts aus der Raney-Nickel-Spaltung

Schmelzpunkt: 199°C (Zersetzung)

Schmelzpunkt von authentischem γ -L-Glutamyl-L-Alanin: 199°C
(Zersetzung)

optische Drehung:

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 7,0^{\circ} \quad (c = 0,1; 0,1 \text{ n HCl})$$

Optische Drehung von authentischem γ -L-Glutamyl-L-Alanin:

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 7,3^{\circ} \quad (c = 0,1; 0,1 \text{ n HCl})$$

IR-Absorption (0,8 mg/150 mg KBr) vom Spaltprodukt der
Raney-Nickel-Spaltung

ν =(cm⁻¹) 640 m, 690 m, 715 w, 760 w, 805 w, 835 w, 910 w,
950 w, 1035 m, 1065 m, 1130 m, 1150 m, 1180 m, 1220 s, 1240 m,
1310 s, 1335 s, 1340 s, 1360 m, 1380 m, 1400 m, 1430 s, 1450 m,
1480 s, 1515 s, 1570 s, 1640 s, 1710 s, 2950 s, 3050 s, 3330 m.

IR-Absorption authentisches γ -L-Glutamyl-L-Alanin der Firma
Senn-Chemicals: (0,83 mg/150 mg KBr)

ν =(cm⁻¹) 640 m, 690 m, 715 w, 760 w, 805 w, 835 w, 910 w,
950 w, 1035 m, 1065 m, 1130 m, 1150 m, 1180 m, 1220 s, 1240 m,
1310 s, 1335 s, 1340 s, 1360 m, 1380 m, 1400 m, 1430 s,
1450 m, 1480 s, 1515 s, 1570 s, 1640 s, 1710 s, 2950 s,
3050 s, 3330 m.

<u>Fließmittel</u>	A; DC	B; DC	C; DC
Rf-Wert des Spaltprodukts	0,06	0,11	0,07
Rf-Wert von auth. γ -L-Glutamyl-L-Alanin	0,06	0,11	0,07

Aus Schmelzpunkt, optischer Drehung, IR-Spektrum, $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum sowie Rf-Werten ergibt sich somit, daß das Raney-Nickel-Spaltprodukt von PMA identisch mit γ -L-Glutamyl-L-Alanin ist.

5.8. Isolierung und Charakterisierung des Geruchsprecursors PMS aus Marasmius scorodonius QUEL.

Die Isolierung erfolgte genau wie für PMA.

Aus 180 g getrocknetem Fruchtkörper von Marasmius scorodonius QUEL. wurden 84 mg PMS erhalten.

Schmelzpunkt: 174°C (Zersetzung)

Optische Drehung: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -5,5^\circ$ ($c = 0,1$; H_2O)

IR-Spektrum: (0,83 mg/130 mg KBr)

$\nu(\text{cm}^{-1})$: 680 m, 695 m, 760 m, 810 m, 845 w, 860 m, 910 w, 950 w, 960 w, 1000 s, 1020 s, 1040 m, 1070 w, 1120 w, 1140 m, 1190 m, 1240 s, 1310 s, 1340 s, 1360 m, 1380 m, 1405 m, 1425 m, 1440 w, 1460 w, 1515 s, 1535 s, 1550 s, 1630 s, 1660 s, 1720 s, 2980 m, 3020 m, 3295 s, 3400 s.

$^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie (in D_2O , 270 MHz)

$\delta = 2,15$ ppm Multipllett 2H ($-\text{CH}-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-$), $\delta = 2,24$ ppm Singulett 3H ($\underline{\text{CH}_3}-\text{S}-$), $\delta = 2,50$ ppm Triplet 2H ($-\text{CO}-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2$), $\delta = 3,30$ ppm AB-Teil eines ABX-Systems 2H ($-\text{CH}-\underline{\text{CH}_2}-\text{SO}-$), $\delta = 3,89$ ppm Triplet 1H ($\text{NH}_2-\underline{\text{CH}}-\text{CH}_2$), $\delta = 4,10$ ppm und $\delta = 4,17$ ppm AB-System 2H ($-\text{SO}-\underline{\text{CH}_2}-\text{S}-$), $\delta = 4,79$ ppm X-Teil des ABX-Teils 1H ($-\text{NH}-\underline{\text{CH}}-\text{CH}_2-$).

Die Säurehydrolyse ergab wie bei PMA L-Glutaminsäure als Spaltprodukt, hydrogenolytische Raney-Nickel-Behandlung γ -L-Glutamyl-L-Alanin.

5.9. Bereitung der gelfiltrierten Rohenzymlösung von Albizzia lophantha

10 g Endospermpulver von Albizzia lophantha wurden in 50 ml m/15 Phosphatpufferlösung pH 8 15 Minuten lang gerührt. Nach Filtrieren und Abpressen des feuchten Endosperms durch eine, mit Watte verschlossene 10 ml Einmalspritze, wurde das Filtrat auf ein mit Sephadex G 25 beschicktes Chromatographierohr ($\varnothing$ 2,0 cm, Länge 60 cm, Füllhöhe 40 cm) gegeben und einer Gelfiltration unterworfen:

Unter Nachwaschen mit m/15 Phosphatpufferlösung pH 8 wurden Fraktionen à 10 ml aufgefangen. Die beim Schütteln schäumenden Fraktionen 7 bis 10 (proteinhaltig) wurden vereinigt und durch Zugabe von Sephadex G 50 auf das 10fache konzentriert. Der Überstand wurde nach Zentrifugieren (3000 U/Min.; 15 Min.) vorsichtig abpipettiert: 2-3 ml Albizzia Rohenzymlösung (geruchlos!). Die Rohenzymlösung wurde bei Bedarf jedesmal frisch bereitet.

5.10. Bereitung der Rohenzymlösungen aus Pilzen von Marasmius scorodonius QUEL. und Marasmius alliaceus JACQ.

5 g Pilzpulver wurden in 15 ml m/15 Phosphatpufferlösung pH 8,0 15 Minuten lang gerührt. Nach Filtrieren und Abpressen des feuchten Pilzpulvers durch eine, mit Watte verschlossene 10 ml Einmalspritze, wurde das Filtrat durch Gelfiltration über Sephadex G 25 von den entstandenen Geruchsstoffen befreit. Die Gelfiltration und anschließende Konzentration der geruchlosen Protein-(Enzym)-Fraktionen erfolgte analog wie für Albizzia lophantha.

Die gelfiltrierten und konzentrierten Fraktionen, die jeweils frisch hergestellt wurden, enthielten den Gesamt-Enzym-Komplex der Pilze, d. h. C-S-Lyase, γ -Glutamyltranspeptidase sowie weitere, nicht näher untersuchte Begleitenzyme.

5.11. Charakterisierung der γ -Glutamyltranspeptidase in den
Pilzen *Marasmius alliaceus* JACO. und *Marasmius scorod-
onius* QUEL.

Die chromatographischen und spektralphotometrischen Untersuchungen wurden nach folgendem Schema durchgeführt:

1 ml Pilzrohenzymlösung (siehe Kap. 5.10.), 5 ml Tris-Citrat-Pufferlösung (Lösung A), 1 ml Substratlösung (Lösung B) und 4 ml einer Akzeptorlösung (Lösung C) bzw. 4 ml Wasser wurden gemischt.

Bereitung der Lösungen:

Lösung A: 3,025 g Tris

7,35 g Natriumcitrat

50 ml Wasser

Diese Lösung wird mit Essigsäure auf pH 8,5 eingestellt und anschließend mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

Lösung B: a) 153 mg Glutathion werden in 10 ml Pufferlösung gelöst. Diese Lösung dient nur zur chromatografischen Bestimmung von Glutaminsäure, entstanden aus der enzymatischen Spaltung von Glutathion.

b) 133,5 mg γ -Glutamyl-4-nitroanilid werden in 10 ml DMSO gelöst.

Diese Lösung dient sowohl zum chromatografischen Nachweis von Glutaminsäure als auch zur spektralphotometrischen Bestimmung von 4-Nitro-Anilin, entstanden jeweils durch enzymatische Spaltung des Substrats.

Lösung C: a) 745 mg Methionin werden in 100 ml Wasser gelöst.

b) 347 mg Hydroxylamin-Hydrochlorid werden in 100 ml Wasser gelöst.

Tropfenweise Zugabe von NaOH-Lösung bis pH 8,5 erreicht ist.

Zur photometrischen Bestimmung von 4-Nitro-anilin werden den

Testlösungen je 1 ml in Zeitabständen (2; 4; 25 Std.) entnommen. Mit Wasser wird im Meßkolben auf 100 ml aufgefüllt, die Farbdichte bei 405 nm gemessen. Die prozentuale Spaltung von γ -Glutamyl-4-Nitroanilid und somit die relativen Enzymaktivitäten verschiedener Pilzenzymfraktionen, lassen sich anhand einer Eichkurve für 4-Nitroanilin bei 405 bzw. 410 nm oder anhand der Mol. Extinktionen von 4-Nitro-anilin ($\epsilon_{(405)} = 9000$; $\epsilon_{410} = 7500$) errechnen.

Die Spaltungsrate betrug für *Marasmius alliaceus* JACQ. nach 25 Std. 15,3 Prozent (mit Akzeptor), für *Marasmius ocorodonus* QUEL. nach 25 Std. 20,6 Prozent (mit Akzeptor).

Für chromatografische Prüfungen werden nach 2, 4, 25 Stunden je 10-20 μ l der Testlösungen auf PC und DC aufgetragen. Als Fließmittel diente n-Butanol/Eisessig/Wasser/Isopropanol. Als Sprühmittel dienten Ninhydrin-, $K_2PtJ_6^-$, $Fe(NO_3)_3$ -Reagenz.

Die Rf-Werte für

γ -L-Glutamyl-L-Methionin	PC: 0,39	DC: 0,22
γ -L-Glutamyl-Hydroxylamin	PC: 0,13	DC: 0,09
L-Glutaminsäure	PC: 0,16	DC: 0,13

5.12. Vorproben auf das Vorkommen von C-S-Lyasen in den drei Pilzarten durch Nachweis der gebildeten Spaltprodukte

5.12.1. Brenztraubensäure-Nachweis (qualitativ)

2 ml einer Rohenzymlösung (Kap. 5.10.) werden mit je 10-50 mg der Testsubstanzen (S-Methyl-, S-Propyl-, S-Allyl-, S-Benzyl-L-Cystein und deren Sulfoxiden, L-Djenkolsäure und L-Cystein) in 10 ml Phosphatpuffer pH 8 1 Stunde lang bei Zimmertemperatur inkubiert. Die Reaktionsgemische wurden mit je 5 ml 10 proz. Trichloressigsäure versetzt und filtriert. Die Filtrate wurden mit je 2 ml einer heißen 2 proz. Lösung von 2,4-Dinitrophenylhydrazin in verdünnter Salzsäure versetzt. Die entstandenen Fällungen werden nach zweistündigem Stehen im Eisschrank abfiltriert und aus Eisessig umkristallisiert.

Der Schmelzpunkt stimmte in allen Fällen mit dem von Brenztraubensäure-2,4-Dinitrophenylhydrazon (Fp: 215-216^oC) überein.

5.12.2. Ammoniak-Nachweis (qualitativ)

Die Reaktionsmischungen, wie unter 5.12.1. bereitet, werden nach 2 Stunden mit einigen Tropfen Neßlers-Reagenz versetzt. Die Lösungen verfärbten sich bräunlich.

5.12.3. Nachweis gebildeter Thiole

5.12.3.1. Geruchsprobe

Alle Rohenzymlösungen waren geruchlos. Nach Zugabe der ebenfalls geruchlosen Testsubstanzen traten allmählich die typischen Gerüche der jeweils gebildeten Mercaptane auf. CH_3SH und $\text{C}_2\text{H}_5\text{SH}$: kohlartiger Geruch, $\text{C}_3\text{H}_7\text{SH}$ und Allyl-SH und Methylendithiol: knoblauchartiger bzw. zwiebelartiger Geruch, Benzyl-SH: Geruch nach verbranntem Gummi.

5.12.3.2. Isolierung von Benzylthiosulfinsäurebenzylester

2 ml einer Rohenzymlösung (Kap. 5.10.) wurden mit 50 mg S-Benzyl-L-Cysteinsulfoxid in 10 ml m/15 Phosphatpufferlösung pH 8,0 inkubiert. Der nach einigen Stunden gebildete Niederschlag wurde abfiltriert, mit wenig Wasser gewaschen und nach Trocknen aus Äther/Petroläther umkristallisiert: 9 mg Kristalle von brennend scharfem Geschmack; Schmelzpunkt 81-83^oC.

5.13. Ammoniak-Bestimmung (quantitativ)

Die Bestimmung erfolgte in Conway-Schalen. Die Conway-Schalen bestehen aus einem Unterteil (Ø 8 cm, Höhe 1,5 cm) und einem dichtschießenden Deckel (beide Teile sind mit Planschliffen versehen, die zur Dichtung mit Vaseline bestrichen wurden). Das Unterteil besitzt eine innere, runde, flache Schale (Ø 3,5 cm, Höhe 0,8 cm) und einen abgetrennten äußeren Ringteil.

Nach Zugabe von Natronlauge zur Reaktionsmischung im äußeren Teil wird Ammoniak freigesetzt. Im inneren Teil befindet sich verdünnte Schwefelsäure, die den gasförmigen Ammoniak über dem Reaktionsgefäß kontinuierlich absorbiert. Die in der inneren Schale quantitativ aufgefangenen NH_4^+ -Ionen werden nach Zugabe von Neßlers-Reagenz photometrisch bestimmt. Anhand einer aufgestellten Eichkurve wurden die Messungen ausgewertet, d. h. also enzymatisch gebildetes NH_3 quantitativ bestimmt.

5.13.1. Aufstellung einer Eichkurve

2 ml, 1 ml, 0,8 ml, 0,4 ml, 0,2 ml und 0,1 ml einer 1 mMol $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung wurden in den äußeren Teil der Conway-Schale pipettiert. Die Conway-Schale wurde zuvor wie folgt vorbereitet: In die innere Schale wurden 2 ml 1 proz. H_2SO_4 -Lösung, in die äußere Schale 3 ml 6n NaOH pipettiert. Nach Zugabe der Ammoniumsulfatlösung wurde der Deckel rasch aufgesetzt und das dicht verschlossene Conway-Gefäß zwei Stunden lang stehen gelassen. Anschließend wurde der inneren Schale genau 1,00 ml entnommen. Nach Zugabe von 0,5 ml Neßlers-Reagenz wurde mit Wasser auf 5,00 ml aufgefüllt. Nach 10 Minuten wurde die Extinktion bei 435 nm gemessen. Als Blindprobe diente eine Lösung aus 1,00 ml 1 proz. H_2SO_4 , 0,5 ml Neßlers-Reagenz und 3,5 ml H_2O .

Aus den abgelesenen Meßwerten wurde eine Eichkurve aufgestellt, die eine direkte Auswertung der späteren Messungen ermöglichte.

5.14. pH-Abhängigkeit der Pilz C-S-Lyasen

Die Enzymaktivität der C-S-Lyasen gegenüber S-Äthyl-L-Cystein bei unterschiedlichen pH-Werten wurde in zwei verschiedenen Puffersystemen gemessen: a) in Phosphat-Puffer nach SOERENSEN (pH 5-8), b) in Tris/HCl-Puffer (pH 7,2-9,0).

Durchführung der Bestimmung:

Aus einer Stammlösung von 37,3 mg (0,01 Mol) S-Äthyl-L-Cystein in 25 ml Wasser wurden je 2 ml entnommen und mit 0,2 ml einer frisch bereiteten Pilzrohenzymlösung (Kap. 5.10.) und 7,8 ml einer Pufferlösung versetzt. Bei folgenden pH-Werten wurden die Bestimmungen durchgeführt:

- a) Phosphatpuffer: 5,0; 6,0; 6,5; 7,0; 7,3; 7,6; 8,0
- b) Tris/HCl-Puffer: 7,5; 7,8; 8,0; 8,5; 9,0

Nach 5 Stunden Inkubation unter gelegentlichem Umschwenken, wurden die enzymatischen Reaktionen durch Zugabe von n NaOH-Lösung zum Reaktionsgemisch gestoppt und das gebildete Ammoniak wie oben beschrieben bei einer Wellenlänge von 435 nm photometrisch bestimmt.

Die Pilz C-S-Lyasen zeigten ihr Optimum im schwach alkalischen Bereich (pH 7,2-8).

5.15. Temperaturabhängigkeit der Aktivität von Pilz C-S-Lyasen

Die Aktivitäten der Enzyme wurden bei folgenden Temperaturen gemessen: 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C und 50°C.

0,2 ml einer Pilzrohenzymlösung (Kap. 5.10.) wurden mit 2 ml einer 0,01 m Lösung, S-Äthyl-L-Cystein versetzt und mit m/15 Phosphatpuffer pH 8 auf 5 ml aufgefüllt. Die Proben wurden 5 Stunden bei den oben angeführten Temperaturen inkubiert und anschließend mit 5 ml n NaOH-Lösung versetzt. Die Ammoniakbestimmung wurde wie oben beschrieben durchgeführt (Kap. 5.13). Der optimale Temperaturbereich zwischen 25°C und 35°C war direkt aus der Eichkurve ablesbar.

5.16. Substratspezifität der Pilz C-S-Lyasen

S-Methyl-, S-Äthyl-, S-Propyl-, S-Allyl-, S-Benzyl-L-Cystein, deren Sulfoxide sowie Djenkolsäure wurden als Substrate getestet. 0,2 ml Pilzrohenzymlösung (Kap. 5.10.) wurden mit je 1 mMol Substrat in m/15 Phosphatpuffer pH 8 inkubiert und bei 30°C gehalten. In Zeitabständen (30 Minuten, 1 Stunde, 2 Stunden, 4 Stunden) wurde gebildetes Ammoniak wie oben (Kap. 5.13.) bestimmt.

Von den L-Cysteinderivaten wurde Benzyl-L-Cystein (79 Prozent)

am besten und L-Djenkolsäure am schlechtesten (33 Prozent) gespalten. Die übrigen Derivate lagen zwischen 64 und 73 Prozent. Die getesteten Cysteinsulfoxide wurden zwischen 35 Prozent und 45 Prozent gespalten.

5.17. Disc-Elektrophorese

5.17.1. Bereitung der 7,5 proz. Polyacrylamidgele

In ein Becherglas werden

5 ml Puffer, pH 8,9 (1,5 Mol Tris, 0,24 Mol HCl)

5 ml Acrylsäureamid-Lösung (28 proz. Acrylsäureamid und 0,75 proz. N, N'-Methylen-bis-acrylsäureamid),

0,1 ml 6 proz. wässrige Lösung von N, N, N', N'-Tetramethyl-äthylendiamin und

10 ml 0,15 proz. Ammoniumperoxidisulfatlösung pipettiert.

Die Lösung wird sofort in silikonisierte Glasröhrchen (75 x 5 mm) gegeben, die an einem Ende mit einer Kunststoffkappe verschlossen sind. Hierzu wird eine Spritze benutzt, die mit einer Kanüle (150 x 1 mm) mit abgeschliffener Spitze versehen ist. Das Kanülenende wird an den Boden des Röhrchens geführt und 1 ml der Lösung so eingefüllt, daß sich keine Luftblasen in der Flüssigkeitssäule befinden. Diese Lösung wird mit dem Puffer von pH 8,9 (s.o.), der mit dem dreifachen Volumen Wasser verdünnt wurde, überschichtet.

Die so beschickten Röhrchen bleiben zur Polymerisation 60 Minuten bei Raumtemperatur stehen. Nach dieser Zeit wird die Verschlusskappe entfernt, die darüber geschichtete Pufferlösung herausgeschleudert und die Geloberfläche mit m/40 Glycin-Puffer (pH 8,3), der wie die Probelösung 10 proz. Rohrzucker enthält, gespült.

5.17.2. Durchführung der Elektrophorese

Es wurden Rohenzymlösungen von den zu untersuchenden Drogen hergestellt (siehe Kap. 5.10.).

Je 1 ml der Rohenzymlösung, 1 ml einer Tris-Pufferlösung pH 8,7 und 5 ml einer gesättigten Saccharoselösung wurden mit einigen Tropfen Bromphenolblaulösung gemischt. 50 µl dieser

Mischung wurden in die Glasröhrchen, in denen sich die vorbereiteten 7,5 proz. Polyacrylamidgele befanden, gefüllt. Anschließend wurden die oberen und unteren Kammern des Behältnisses, in denen 12 Glasröhrchen mit den 7,5 proz. Polyacrylamidgelen steckten, mit Elektrodenpuffer (Tris-Glycin pH 8,7) soweit aufgefüllt, daß die Glasröhrchen sich mit den oberen und unteren Enden in der Pufferlösung befanden. Es mußte darauf geachtet werden, daß bei diesem Vorgang keine Luftblasen an den Spitzen der Gele verblieben.

Die Dauer der Elektrophorese betrug etwa 2 1/2 Stunden bei 2,5 mA pro Gel. Es wurde jeweils die Elektrophorese beendet, wenn Bromphenolblau, sichtbar als schmale Bande, durch das Gel gewandert war.

Die Gele wurden aus den Glasröhrchen mit Hilfe einer Injektionsspritze, die mit Glycerin/Wasser gefüllt war, folgendermaßen herausgenommen: Die Injektionsnadel wurde vorsichtig an der Glaswand, unter gleichzeitigem Drehen des Röhrchens und Einspritzen des Glycerin-Wasser-Gemischs herumgeführt und so tief eingeführt, daß sich das Gel von der Glaswand löste. Beim geschickten Herausziehen der Nadel konnte gleichzeitig das Gel mit herausgezogen werden.

Die Gele wurden nun zweimal in 0,1 M Tris-Puffer pH 8,5 gewaschen und in Reagenzgläser ($\varnothing$ 1 cm, Länge 10 cm) gegeben, in denen sich eine Lösung von L-Cystein (10 mMol) und Bleiacetat (5 mMol) in 0,25 M Tris-Citrat-Puffer pH 8,5 befand. Zur Aktivierung der Isoenzyme und Beschleunigung der Anfärbung der Banden, wurden pro Reagenzglas 2 Tropfen einer 1 proz. wässrigen PALP-Lösung zur obigen Lösung hinzugefügt.

Die Inkubationszeit für *Albizzia lophantha* betrug 1 Stunde, für *Marasmius scorodonius* QUEL. 3 Stunden, für *Marasmius allia-ceus* JACQ. 6 Stunden und für die übrigen 12 Stunden.

Nach dieser Zeit wurden die Gele jeweils in 3 proz. Trichlor-essigsäure gewaschen und in den Reagenzgläsern in Wasser aufbewahrt. Die schwarz-braun gefärbten Zonen der Isoenzyme wurden zur Dokumentation abgezeichnet oder fotografiert.

5.18. Synthesen der verwendeten L-Cysteinderivate mit
einigen charakteristischen Daten

Aminosäure	Darstellung (Lit.)	Schmelzpunkt	optische Drehung
S-Methyl-L-Cystein	9	216°C (Zers.)	$[\alpha]_D^{23} = -23,6$ (c=1; H ₂ O)
S-Äthyl-L-Cystein	2,9	260°C (Zers.)	$[\alpha]_D^{23} = -22,8$ (c=5; H ₂ O)
S-Propyl-L-Cystein	65	242-243°C (Zers.)	$[\alpha]_D^{23} = -24,9$ (c=2,5; H ₂ O)
S-Allyl-L-Cystein	65	218°C (Zers.)	$[\alpha]_D^{23} = -16,4$ (c=2,5; H ₂ O)
S-Benzyl-L-Cystein	2	215-216°C (Zers.)	$[\alpha]_D^{23} = +19$ (c=5; 1n NaOH)
N-Acetyl-S-2-Naphthyl- DL-Cystein	2,65	122-123°C (Zers.)	$[\alpha]_D^{20} = -23,0$ (c=0,1; 0,1n NaOH)
S-2(Naphtyl)-L- Cystein	2,65	204°C (Zers.)	-
S-(4-Nitrophenyl)- L-Cystein	48	150°C (Zers.)	-
S-2-(5-Nitropyri- dyl)-L-Cystein	2	178°C (Zers.)	$[\alpha]_D^{20} = -116^{\circ}$ (c=1; 0,5n HCl)
N-Acetyl-S-2-(5-Ni- tropyridyl)-L-Cystein	2	156°C (Zers.)	$[\alpha]_D^{20} = -35^{\circ}$ (c=1,0,5n HCl)
S-Methyl-L- Cysteinsulfoxid	65	163°C (Zers.)	$[\alpha]_D^{23} = -28,8$ (c=5; H ₂ O)

Aminosäure	Darstellung	Schmelzpunkt	optische Drehung
S-Äthyl-L-Cystein-sulfoxid	65	161°C (Zers.)	$[\alpha]_D^{23} = +16,6$ (c=5; H ₂ O)
L-Propyl-L-Cystein-sulfoxid	65	150-152°C (Zers.)	$[\alpha]_D^{23} = -11$ (c=2; H ₂ O)
S-Allyl-L-Cystein-sulfoxid	65	146-147°C (Zers.)	$[\alpha]_D^{23} = -10$ (c=0,8; H ₂ O)
S-Benzyl-L-Cystein-sulfoxid	65	158-159°C (Zers.)	$[\alpha]_D^{23} = +0$ (c=2,1; 1n NaOH)

5.19. Elementaranalysen einiger neuer C-S-Lyase-Substrate

- 1) S-(4-Nitrophenyl)-L-Cystein $C_9H_{10}N_2O_4S$
 Berechnet für 243,15: C 44,82; H 4,14; N 11,52; S 13,22 %
 Gefunden: C 44,63; H 4,14; N 11,97; S 10,66 %
- 2) S-2-(5-Nitropyridyl)-L-Cystein $C_8H_9N_3O_4S$
 Berechnet für 243,23: C 39,50; H 3,72; N 17,28; S 13,16 %
 Gefunden: C 40,12; H 3,77; N 17,50; S 13,98 %
- 3) N-Acetyl-S-2-(5-Nitropyridyl)-L-Cystein $C_{10}H_{11}N_3O_5S$
 Berechnet für 285,27: C 42,10; H 3,88; N 14,72; S 11,22 %
 Gefunden: C 41,45; H 3,56; N 15,39; S 9,3 %

5.19.1. Zugehörige IR-Absorptionsbanden

- 1) S-(4-Nitrophenyl)-L-Cystein (0,8 mg/150 mg KBr)
 ν (cm⁻¹): 620 w, 670 w, 685 w, 718 w, 730 s, 742 m, 830 m,
 900 w, 940 w, 995 w, 1080 m, 1100 s, 1150 w, 1175 w,
 1235 m, 1281 s, 1330 s, 1385 s, 1415 m, 1435 s, 1467 s,
 1487 s, 1500 s, 1570 s, 1620 s, 2950-3100 m, 3380-3440 m.

- 2) S-2-(5-Nitropyridyl)-L-Cystein (0,8 mg/150 mg KBr)
 ν (cm^{-1}): 624 w, 702 w, 738 m, 775 w, 832 m, 848 m, 925 w,
940 w, 994 w, 1038 w, 1090 s, 1110 m, 1125 m, 1141 w,
1183 w, 1210 w, 1248 w, 1265 s, 1335 s, 1390 s, 1428 w,
1440 m, 1505 s, 1554 s, 1577 s, 1600 s, 1635 s, 1805 w,
1870 w, 1950 w, 1970 w, 2075 w, 2510 m, 2840 m, 2925 m,
3025-3040 m, 3070 m, 3410-3440 m.
- 3) N-Acetyl-S-2-(5-Nitropyridyl)-L-Cystein (0,8 mg/150 mg KBr)
 ν (cm^{-1}): 700 w, 739 m, 760 w, 820 w, 828 w, 844 m, 900 w,
925 w, 945 w, 970 w, 1000 w, 1030 w, 1092 s, 1128 m, 1175 m,
1200 s, 1247 w, 1265 s, 1290 w, 1330 s, 1365 m, 1390 w,
1412 w, 1430 w, 1440 w, 1498 s, 1515 s, 1557 s, 1575 s,
1620 s, 1717 s, 2510 w, 2840 w, 2920 w, 2990 w, 3070 w,
3290 w, 3400 m.
- 4) S-2-(Naphthyl)-L-Cystein (0,8 mg/150 mg KBr)
 ν (cm^{-1}): 611 w, 650 w, 705 w, 728 m, 789 w, 806 w, 835 w,
847 w, 885 w, 933 w, 950 w, 1038 w, 1058 w, 1095 w, 1120 w,
1177 w, 1260 w, 1277 m, 1300 w, 1335 s, 1355 m, 1385 s,
1420 s, 1500 s, 1535 s, 1570 s, 1600 s, 2060 w, 2970 s,
3040 m, 3150 m, 3410-3440 m.

5.19.2. Zugehörige UV-Spektren

- 1) S-(4-Nitrophenyl)-L-Cystein:
 $\lambda_{\text{max.}}$ = 321,8 nm, (in Methanol c = 0,81/100 ml)
- 2) S-2-(5-Nitropyridyl)-L-Cystein:
 $\lambda_{\text{max.}}$ = 320,0 nm (in Methanol c = 0,91/100 ml)
- 3) N-Acetyl-S-2-(5-Nitropyridyl)-L-Cystein:
 $\lambda_{\text{max.}}$ = 329,0 nm; Nebenmaximum $\lambda_{\text{max.}}$ = 281 nm (Methanol
c = 1,01/100 ml)

VI. DISKUSSION

Das vorliegende Ergebnis zeigt, daß das erstmals isolierte γ -L-Glutamyl-3-(Methylthiomethylsulfinyl)-L-Alanin (γ -Glutamyl-Marasmin) der Geruchsprecursor der drei Pilzarten *Marasmius scorodonius* QUEL., *Marasmius alliaceus* JACQ. und *Marasmius prasiosmus* FR., ist. Diese Verbindung weicht von den bisher bekannten Cysteinderivaten ab, da die Seitenkette nicht ausschließlich aus C-Atomen aufgebaut ist, sondern alternierend in ihr C-Atome mit S-Atomen verbunden sind. Dieses völlig neue Schema wurde erstmals in Sparsomycin, in jüngster Zeit auch in einigen Pilzarten, wie *Lentinus edodes*, *Collybia hariolorum*, *Micromphale perforans* gefunden.

Die Spaltung des Dipeptides, γ -Glutamyl-Marasmin, verläuft über zwei enzymatische Stufen in einer Art α , β -Eliminierung zu einem bisher noch nicht bekannten Geruchsstoff (Abb. 28). Der erste Schritt ist die Spaltung des Dipeptides und Übertragung der Glutaminsäure auf eine andere Aminosäure durch eine γ -Glutamyltranspeptidase. Der zweite ist die Spaltung des verbliebenen Cysteinderivats durch eine C-S-Lyase unter Bildung von Brenztraubensäure, Ammoniak und wahrscheinlich einer sehr instabilen Sulfensäure, die sich weiter in Disulfide umlagert, wobei sich somit nach einiger Zeit der typische Geruch entwickelt.

Enzyme vom Typ der beiden hier beteiligten, sind in der Literatur schon früher beschrieben, jedoch wurde ein enzymatischer Zweistufenprozeß dieser Art nur bei *Lentinus edodes* gefunden. Die *Marasmius*-C-S-Lyase zeichnet sich, ähnlich wie bei *Albizzia lophantha*, durch ihr großes Wirkungsspektrum aus. Es werden S-Alkyl-L-Cysteinderivate, deren Sulfoxide und L-Cystein gespalten.

Erstmalig wurde nachgewiesen, daß die C-S-Lyasen, sowohl aus höheren Pflanzen, als auch aus verschiedenen Pilzen, immer einen Isoenzymkomplex darstellen. Für die Sichtbarmachung existierten keine geeigneten Substrate, deren Spaltprodukte zu sichtbaren, möglichst gefärbten Produkten führen, so daß einige chromogene Substrate von L-Cystein synthetisiert wurden.

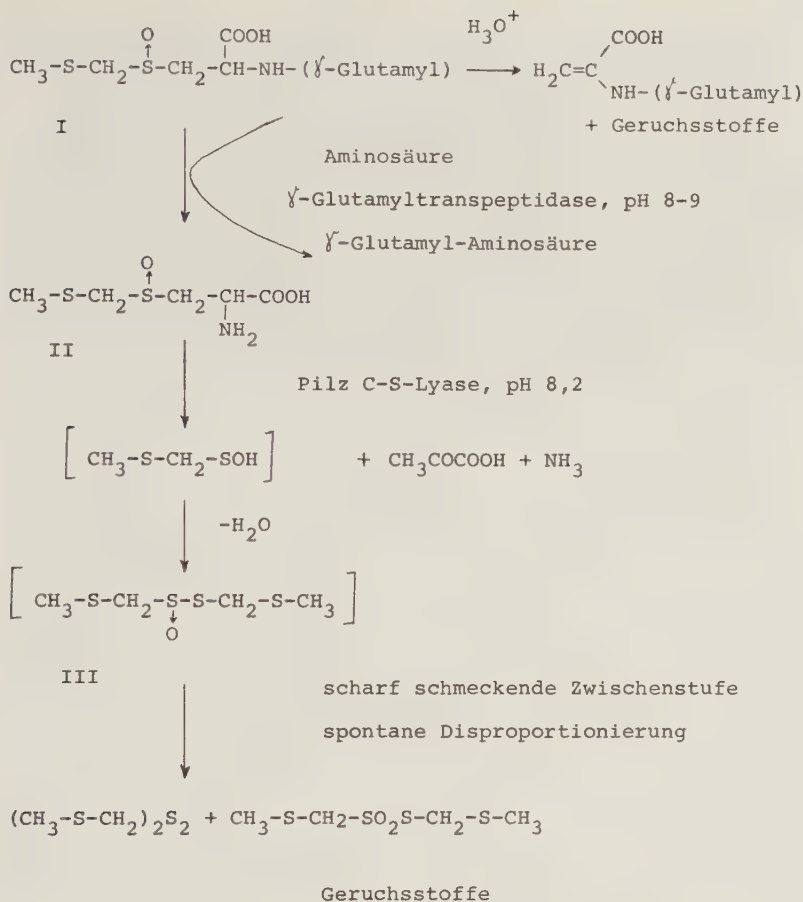


Abb. 28: Möglicher enzymatischer und hydrolytischer Abbau von γ -Glutamyl-Marasmin

Da das pH-Optimum der C-S-Lyasen im schwach alkalischen pH-Bereich liegt, die chromogenen Substanzen aber in diesem pH-Bereich schon Umlagerungen erfahren, konnten mit diesen Substraten nicht die erhofften Ergebnisse erzielt werden. Als ausgesprochen günstig erwies sich der neu gefundene Nachweis des durch die enzymatische Spaltung aus L-Cystein entstandenen Schwefelwasserstoffes durch Blei-Ionen. Überraschend ist, daß die C-S-Lyasen durch die Gegenwart von Bleisalzen nicht gehemmt werden. Die Isoenzymbanden, die nach dieser Reaktion in PAA-Gelen entstanden waren, zeichneten sich durch die gut sichtbare dunkelbraun-schwarze Farbe aus.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

- 1) Aus den Fruchtkörpern der Basidiomyceten *Marasmius scorodonium* QUEL. und *Marasmius alliaceus* JACQ. wurde der Precursor γ -L-Glutamyl-3-(Methylthiomethylsulfinyl)-L-Alanin (γ -Glutamyl-Marasmin) des bisher noch unbekannten Geruchsstoffes in kristalliner Form isoliert. Chromatographisch konnte gezeigt werden, daß γ -Glutamyl-Marasmin auch in *Marasmius prasiosmus* FR. vorkommt. Die spektroskopischen und analytischen Daten, sowie die durchgeführten Spaltungsreaktionen, vor allem die Raney-Nickel-Spaltung, sind beweisend für die Struktur von γ -Glutamyl-Marasmin.
- 2) In allen drei Pilzarten konnten γ -Glutamyltranspeptidasen festgestellt werden. Ihre Aktivität konnte in *Marasmius scorodonium* QUEL. und *Marasmius alliaceus* JACQ. durch γ -L-Glutamyl-4-Nitroanilid als Substrat mit und ohne Akzeptoren bestimmt werden.
- 3) In allen drei Pilzarten wurden C-S-Lyasen nachgewiesen. Die C-S-Lyasen von *Marasmius scorodonium* QUEL. und *Marasmius alliaceus* JACQ. wurden gegen verschiedene, synthetische Substrate getestet und dabei ihre Substratspezifität ermittelt. Außerdem wurden die Temperaturmaxima und die pH-Optima der C-S-Lyasen bestimmt.
- 4) Die C-S-Lyasen konnten erstmals als komplex zusammengesetzte Isoenzymgemische erkannt werden, die sich mit Hilfe der Disc-Elektrophorese in 7,5 proz. Polyacrylamidgelen auftrennen ließen. Als neues und zuverlässiges histochemisches Nachweisreagenz diente ein Gemisch aus L-Cystein und Bleiaceetat. Durch gebildetes unlösliches Bleisulfid zeigten sich die Isoenzymbanden als deutlich erkennbare schwarzbraune Zonen.
- 5) Die Bildung des *Marasmius*-Geruchsstoffes, für den die Struktur $\text{CH}_3\text{-S-CH}_2\text{-S-S-CH}_2\text{-S-CH}_3$ vorgeschlagen wird, erfolgt zweistufig durch Enzyme:
 - I. γ -Glutamyl-Marasmin wird durch eine γ -Glutamyltranspeptidase in L-Glutaminsäure und Marasmin gespalten.

II. Marasmin wird durch C-S-Lyase-Isoenzyme in Brenz-
traubensäure, Ammoniak und scharf schmeckendes
 $\text{CH}_3\text{-S-CH}_2\text{-S-S-CH}_2\text{-S-CH}_3$ gespalten.

$\downarrow$
O
Letzteres disproportioniert vermutlich in $\text{CH}_3\text{-S-CH}_2\text{-S-SO}_2\text{-CH}_2\text{-S-CH}_3$ und $\text{CH}_3\text{-S-CH}_2\text{-S-S-CH}_2\text{-S-CH}_3$, wobei die Bildung zusätzlicher noch unbekannter Zerfallsprodukte durchaus als möglich erscheint.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

- (1) ARGOUEDELIS, A. D. and HERR, R. R. (1962)
Antimicrob. Ag. Chemoth. 780
- (2) ARMSTRONG, M. D. and LEWIS, J. D. (1951)
J. org. Chemistry 16, 749
- (3) ARNOLD, W. N. and THOMPSON, J. F. (1962)
Biochem. Biophys. Acta 57, 604
- (4) BREITMAIER, E. and VOELTER, W. (1974)
13C-NMR-Spektroskopie,
Verlag Chemie, Weinheim
- (5) CALAM, D. H. and WALEY, S. G. (1963)
Biochem. J. 86, 226
- (6) CHALLENGER, F. (1959)
Aspects of Organic Chemistry of Sulphur
Butterworths Scientific Publications, London
- (7) CONWAY, E. J. (1962)
Microdiffusion Analysis and Volumetric Error
5th Edit., Crosby Lockwood and Son Ltd. London
- (8) DAVIS, B. J. (1964)
Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 404
- (9) DU VIGNEAUD, V., LORING, H. S. and CRAFT, H. A. (1934)
J. biol. Chemistry 105, 481
- (10) EVANS, M. and BOULTER, D. (1975)
Qual. Plant.-Pl. Fds. hum. Nutr. XXIV, 3/4 257
- (11) FOWDEN, L., LEWIS, D. and TRISTRAN, H. (1967)
Adv. Enzymol. 29, 89
- (12) GEIGY, Wissenschaftliche Tabellen, 7. Auflage (1969)
- (13) GIGLIOTTI, H. J. and LEVENBERG, B. (1964)
J. Biol. Chem. 239, 2274
- (14) GMELIN, R. (1959)
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 316, 164
- (15) GMELIN, R. (1962)
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 327, 186
- (16) GMELIN, R., HASENMAIER, G. und STRAUSS, G. (1957)
Z. Naturf. 126, 687
- (17) GMELIN, R. und HIETALA, P. K. (1960)
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 322, 278

- (18) GMELIN, R., KJAER, A. und LARSEN, P. O. (1962)
Phytochemistry 1, 233
- (19) GMELIN, R., KJAER, A. und SCHUSTER, A. (1968)
Acta Chem. Scand. 22, 2875
- (20) GMELIN, R., LUXA, H.-H., TREVES, M., HÖFLE, G. und HATANAKA,
(1976) in Vorbereitung
- (21) GMELIN, R., STRAUSS, G. und HASENMAIER, G. (1958)
Z. Naturforsch. 13 b, 252
- (22) GMELIN, R. und VIRTANEN, A. I. (1959)
Suomen Kemistilehti B32, 236
- (23) GRANROTH, B. and VIRTANEN, A. I. (1967)
Acta Chem. Scand. 21, 1654
- (24) HARPER, H. A., LÖFFLER, G., PETRIDES, P. E. und WEISS, L.
Physiologische Chemie, Springer Verlag, Berlin,
Heidelberg, New York (1975)
- (25) HEGNAUER, R.
Chemotaxonomie der Pflanzen Vol. 2,
Birkhäuser Verlag, Basel und Stuttgart (1963)
- (26) HENZE, R. E. (1957)
Dissert. Abstr. 17, 1456
- (27) HORSLEY, W. J., STRENLICHT, H. and COHEN, J. S. (1970)
J. Am. Chem. Soc. 92, 680
- (28) ITO, K. and FOWDEN, L. (1972)
Phytochemistry 11, 2541
- (29) JACOBSEN, J. V., YAMAGUCHI, M., MANN, L. K. and HOWARD,
F.D. (1968)
Phytochemistry 7, 1099
- (30) JOHNSON, L. F. and JANKOWSKI, W. C. (1972)
Carbon-13-NMR-Spektren, Wiley Interscience,
New York
- (31) KARRER, P. and EUGSTER, C. H. (1949)
Helv. Chim. Acta. 32, 957, 2397
- (32) KRAUSS, G.-J. und REINBOTHE, H. (1970)
Biochem. Physiol. Pflanzen 161, 243
- (33) KRAUSS, G.-J. und REINBOTHE, H. (1973)
Phytochemistry 12, 125
- (34) KUPIECKI, F. P. und VIRTANEN, A. I. (1960)
Acta Chem. Scand. 14, 1913
- (35) KURIYAMA, M., TAKAGI, M. and MURATA, K. (1960)
Bull. Fac. Fisheries, Hokkaido Univ.
(Japan) 11, 58; C. A. 55 (1961) 13559

- (36) KUTTAN, R., GOPALAN NAIR, N., RADHAKRISHNAN, A. N., SPANDE, T. F., YEH, H. J. and WITKOP, B. (1974)
Biochemistry 13, 4394
- (37) MASCRÉ, M. (1937)
Compt. rend. 204, 8, 190
- (38) MATIKKALA, E. J. und VIRTANEN, A. I. (1963)
Acta Chem. Scand. 17, 1799
- (39) MATIKKALA, E. J. und VIRTANEN, A. I. (1966)
Suomen Kemistilehti B39, 201
- (40) MAZELIS, M. (1963)
Phytochemistry 2, 15
- (40a) MAZELIS, M. and CREVELING, R. K. (1975)
Biochem. J. 147, 485
- (41) MC RORIC, R. A., SUTHERLAND, G. L., LEWIS, M. S., BARTON, A. D., GLAZENER, M. R. and SHIRE, W. (1954)
J. Am. Soc. Chem. 76, 115
- (42) MEISTER, A. (1973)
Glutathione, Proceedings 16th Confer. Germ. Soc. Biol. Chem., Tübingen, p. 56-68
- (43) MICHAEL, E. und HENNIG, B.
Handbuch für Pilzfreunde, 1. Band (1968)
Handbuch für Pilzfreunde, 3. Band (1964)
VEB Gustav Fischer Verlag, Jena
- (44) MOISIO, T., SPÄRE, C. G. and VIRTANEN, A. I. (1962)
Suomen Kemistilehti 35B, 29
- (45) MORRIS, C. J. and THOMPSON, J. F. (1956)
J. Am. Chem. Soc. 78, 1605
- (46) NOMURA, J., NISHIZUKA, Y. and HAYAISHI, O. (1963)
J. Biol. Chem. 238, 1441
- (47) OOMORI, S. and MIZUHARA, S. (1960)
Biochem. Biophys. Research Comm. Vol. 3, No. 4, 343
- (48) ORGANIKUM, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaft, 7. Auflage (1967)
- (49) OSTERMAYER, F. and TARBELL, D. F. (1960)
J. Am. Chem. Soc. 82, 3752
- (50) PYYSALO, H. (1975)
Studies of volatile compounds in mushrooms
Technical Research Centre of Finland, Materials and Processing Technology, Publication 13
- (51) RAYLAND, J. B. und LIVERMAN, J. L. (1956)
Arch. Biochem. Biophysics 65, 574

- (52) REINBOTHE, H. (1963)
Habilitationsschrift, Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg
- (53) RENZ, J. (1936)
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 244, 153
- (54) RINDERKNECHT, H., THOMAS, D. and ASLIN, S. (1958)
Helv. Chim. Acta 41, 1
- (55) ROBERTS, G. C. K. and JARDETZKY, O. (1970)
Advances in Protein Chemistry 24, 447-545
- (56) SCHLOSSMANN, K. und LYNEN, F. (1957)
Angew. Chemie 69, 179
- (57) SCHLÜTER, M. (1971)
Dissertation Freie Universität Berlin
- (58) SCHMID, H. and KARRER, P. (1948)
Helv. Chim. Acta 31, 1017
- (59) SCHNEIDER, W. and SCHÜTZ, L. A. (1913)
Ber. dtch. chem. Ges. 46, 2634
- (60) SCHULTZ, O. E. und GMELIN, R. (1952)
Z. Naturforsch. 7b, 500; (1953) 8b, 151
- (61) SCHWIMMER, S. and KJAER, A. (1960)
Biochim. Biophys. Acta 42, 316
- (62) SCHWIMMER, S. und MAZELIS, M. (1963)
Arch. Biochem. Biophys. 100, 66
- (63) SENEVIRATNE, A. S. und FOWDEN, L. (1968)
Phytochemistry 7, 1039
- (64) SMITH, I. K. (1967)
Ph. D. Thesis, London Univ.
- (65) STOLL, A. und SEEBECK, E. (1947)
Exper. 3, 114; (1948) Helv. Chim. Acta 31, 189
- (66) STOLL, A. und SEEBECK, E. (1950)
Scientia Pharmaceutica 18, 61
- (67) SUZUKI, T., SUGII, M. and KAKIMOTO, T. (1961)
Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 9, 77;
[C. A. 55 (1961) 21258]
- (68) SUZUKI, T., SUGII, M., KAKIMOTO, T. (1962)
Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 10, 328;
[C. A. 57, (1962), 11561]
- (69) SUZUKI, T., SUGII, M., KAKIMOTO, T. and TSCEBOI, N. (1965)
J. Biochem. (Tokyo) 58, 279

- (70) SYNGE, R. C. M. und WOOD, J. C. (1955)
Biochem. J. 60, 15
- (71) SZASZ, G. (1970) Methoden der enzymatischen Analyse,
H.U., 2. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim
- (72) THOMPSON, J. F., MORRIS, C. J. and ZACHARIUS, R. H. (1956)
Nature (London) 178, 593
- (73) THOMPSON, J. F., TURNER, D. H. and GERING, R. K. (1964)
Phytochemistry 3, 33
- (74) TOLOSA, E. A., CHEPURNOVA, N. K., KHOMUTOV, R. M., SEVERIN,
E. S. (1969)
Biochem. Biophys. Acta 171, No. 2, 369
- (75) TOMINAGA, F. and OKA, K. J. (1963)
Biochem. (Tokyo) 54, 222
- (76) TSUNO, S. J. (1958) Bitamin 14, 665; [C.A. 55 (1961)
12569]
- (77) VAN VEEN, A. G. und HYMAN, A. J. (1933)
Geneeskund. Tijdschr. Nederl.-Indie 73, 991;
(1935) Recu. Trav. chim. Pays-Bas 54, 493
- (78) VIRTANEN, A. I., HATANAKA, M. und BERLIN, M. (1962)
Suomen Kemistilehti B35, 52
- (79) VIRTANEN, A. I. und MATIKKALA, E. J. (1959)
Acta Chem.Scand. 13, 1898
- (80) VIRTANEN, A. I. und MATIKKALA, E. J. (1960)
Suomen Kemistilehti B33, 83
- (81) VIRTANEN, A. I. und MATIKKALA, E. J. (1961)
Suomen Kemistilehti B34, 53 und 84
- (82) VIRTANEN, A. I. und MATTILA, J. (1961)
Suomen Kemistilehti B34, 44, 72
- (83) VIRTANEN, A. I. und MATIKKALA, E. J. (1961)
The Botanic Magazine, (Tokyo) 79, Nos. 940-
941, 506
- (84) VIRTANEN, A. I. und MATIKKALA, E. J. (1962)
Suomen Kemistilehti B 35, 245
- (85) VIRTANEN, A. I. und MATIKKALA, E. J. (1966)
Suomen Kemistilehti B 39, 201
- (86) VIRTANEN, A. I. und MATIKKALA, E. J. (1967)
Acta Chem. Scand. 21, 2891
- (87) WARIN, P., JADOT, J. and CASIMER, F. (1969)
Extrait Bull.Soc.r. Sci. Liège 38, 280

- (88) WILEY, P. F. and MAC KELLAR, F. A. (1970)
J. Am. Chem. Soc. 92, 417
- (89) WOLFF, E. C. and BLACK, S. (1956)
J. Am. Chem. Soc. 78, 5958
- (90) YASUMOTO, K. IWAMI, K. and MITSUDA, H. (1974)
Abstracts IX th Internation. Scientif. Congr.
of the Cultivation of Edible Fungi. 5-3. Tokyo,
Japan
- (91) ZACHARIUS, R. H. (1959)
Arch. Biochem. Biophys. 80, 199
- (92) WESTALL, R. G. (1953)
Biochem. J. 55, 244
- (93) NAIMIE, H. SAMEK, Z., DOLEJŠ, L. und ŘEHÁČEK, Z. (1972)
Coll. Czech. Chem. Comm. 37, 1166
- (94) BINKLEY, F. (1950) J. Biol. Chem. 186, 287
- (95) HANSEN, S. E., KJAER, A. and SCHWIMMER, S. (1959)
Comptes rendus des travaux du Laboratoire
Carlsberg Vol. 31, No. 13
- (96) ROWLANDS, D. A. and YOUNG, G. T. (1957)
Biochem. J. 65, 516
- (97) SACHS, H. and BRAND, E. (1953)
J. Am. Chem. Soc. 75, 4608
- (98) ORNSTEIN, L. (1964)
Ann. N. Y. Acad. Sc. 121, 321
- (99) HINE, R. and ROGERS, D. (1956)
Chem. and Ind. 1428
- (100) CHEUNG, K. K., KJAER, A. and SIM, G. A. (1965)
Chem. Comm. No. 6, 100

IX. LEBENSLAUF

Am 11. Januar 1944 wurde ich als Sohn des Kaufmanns Paul Luxa und seiner Ehefrau Elli, geb. Schober, in Lötzen/Ostpreußen, geboren.

Nach fünfjährigem Grundschulbesuch in Klein-Schneen und Göttingen besuchte ich die dortige Felix-Klein-Oberschule bis Dezember 1956.

Ab Dezember 1956 bis zum Frühjahr 1965 besuchte ich die Goetheschule in Einbeck.

Das Apotheker-Praktikum absolvierte ich ab April 1965 in der Rats-Apotheke in Einbeck; es wurde am 14.3.1967 in Hildesheim mit der Pharmazeutischen Vorprüfung abgeschlossen. Im Oktober 1967 begann ich das Chemiestudium in Göttingen. Ab April 1968 studierte ich Pharmazie in Berlin und bestand im Frühjahr 1971 das Pharmazeutische Staatsexamen.

Nach halbjähriger Kandidatenzeit in der Finckenstein-Apotheke in Berlin, begann ich, unter der Leitung von Herrn Professor Dr. R. Gmelin Inhaltsstoffe verschiedener Pilze zu untersuchen.

Seit dem 1. Oktober 1972 bin ich zunächst als wissenschaftlicher Tutor und seit dem 1. Oktober 1974 als wissenschaftlicher Assistent am Institut für Pharmakognosie und Phytochemie der Freien Universität Berlin tätig.

difo-druck · 8600 bamberg
untere königstraße 30